

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمار تليجي الاغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

قسم البيولوجيا

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : *Sciences Biologique*

Option : *Microbiologie appliquée*

THEME

**Etude de la contamination de certains condiments utilisés dans
la région de Laghouat par une Bactérie sporulée *Bacillus
cereus***

Devant le jury composé de :

Présenté par :

Président: Mr. KHEDIM Rabah MAB

Miles :

Examineur: Mr. ZEROUKI M. Houcine MAA.

LAGGOUNE: Mounia.

Promoteur: Mr. MADOURI Redouane MAA

NOUREDDINE Fatima Zohra Hana.

NAOUMI Fatima Zohra Nada.

Soutenu publiquement le : 27 Septembre 2020.

Dédicace

Grace à ALLAH tout puissant qui m'a aidé, orienté et guidé Je
dédie *ce modeste travail* :

Aux êtres les plus chers du monde.

Ma mère, Mon père.

*Qui ont été toujours à mes côtés pour me conseiller, m'encourager et me soutenir
durant toutes ces années.*

Leur amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui

A mes frères (Madani, Abdelkrim).

A mes chères sœurs (Manal, Faiza) et leurs maris.

*A mes chers neveux (Mohammed et Siradj Eddine) et adorables nièces (Annahid,
Yassamine).*

Que dieu les protèges et leur offres la chance et le bonheur.

A mes chers grands-parents.

*A cette âme pure que nous avons perdue dernièrement, cher oncle Taher Talbi A
Mes oncles et Tantes, particulièrement Zouzou.*

*A chères cousines spécialement, Mami, Isra, Wafya, Sissi, Marieme, Chaima, Nour A
ma binôme l'adorable Hana.*

A ma meilleure, Ikram

A tous les collègues de la promotion 2020 surtout à Nadjia, Fatima, Mebarka

Mounia



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A la personne qui m'a fait tenir debout à ce jour à la personne qui m'a appris le bien et le mal et la confiance suffisante pour être la femme aujourd'hui

Ma chère mère.

À mon cher père, mon premier et dernier soutien

À ma seule sœur, Amina, et ses filles, Jehanne et Aya

A mes frères, chacun avec son nom et sa position.

À une amie de ma vie, Sakina Barachemi

À ma Partenaire dans ce travail et à la merveilleuse personne Mounia Laggoune.

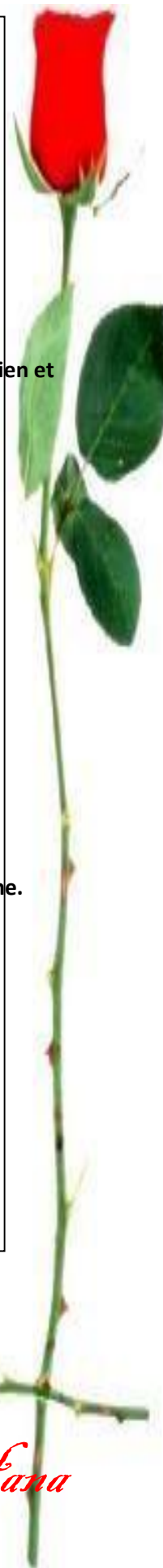
A tous ceux qui m'ont souri un jour.

A tous ceux qui m'ont dit un mot gentil lors d'une mauvaise journée.

À tous ceux qui m'aimaient de près ou de loin.

Enfin, je me dédie ce travail avec fierté à moi-même.

Hana



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A ma famille

Elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Particulièrement :

A mon Père EL HADJ BACHIR pour l'effort qu'il a suscité en moi de par sa rigueur

A toi ma défunte Mère Hamdi Salima qui j'aurai aimé qu'elle soit là c'est le meilleur cadeau que je puisse t'offrir

A vous mes frères Abdessamed, Sadek et TAHA sans oublier ma sœur SAFA

Qui ont été toujours me soutenue

A Mr MADOURI Redouane

Pour son encadrement exceptionnel, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation à ce mémoire

Sans oublier bien-sûr les membres du Jury (Mr KHEDIM et Mr ZEROUKI

Nada

Remerciements

Nous commençons par remercier et rendre grâce à Dieu tout puissant de nous avoir mis sur le chemin droit pour avoir atteint notre but et de nous avoir donné le courage et la volonté de faire ce travail.

Nous sommes profondément reconnaissantes à notre encadreur Mr MADOURI Redouane de nous avoir aidé à travailler sur un sujet passionnant. Il a su guider nos premiers pas dans un domaine peu défriché. Nous a consacré du temps malgré ses préoccupations, et s'est chaleureusement intéressé à chacun de nos résultats.

C'est un honneur pour nous que Mr KHEDIM et Mr ZEROUKI aient accepté de bien vouloir juger notre travail. Nous leur présentons nos remerciements les plus respectueux.

Nous remercierons :

Mr MESSAOUDI qui nous a orientés durant toute notre expérimentation.

Un immense remerciement à tous les membres des laboratoires de département de la biologie pour leurs conseils, leur soutien et la chaleur familiale avec laquelle ils nous ont entouré.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Dédicace | I |
| Remerciements | IV |
| Table des matières | V |
| Liste des abréviations | VII |
| Liste des figures..... | VIII |
| Liste des tableaux | IX |
| Résumé : | X |
| I.1. Revue sur la microbiologie prévisionnelle | 16 |
| I. 1.1 Application, maîtrise et intérêts de la microbiologie prévisionnelle | 16 |
| I.1.2. Classification de modèles de la microbiologie prévisionnelle | 17 |
| I.1.2.1 Modèle primaire de croissance | 17 |
| I.1.2.2. Modèles secondaires de croissance..... | 20 |
| I.1.2.3. Modèles tertiaires..... | 21 |
| I.2.Généralités sur les condiments et les épices..... | 23 |
| I.2.1. Définition et caractéristiques des épices..... | 23 |
| I.2.3. La relation entre le couple (Microorganisme-Aliment)..... | 25 |
| I.2.4. Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) liées à <i>B. cereus</i> | 29 |
| I.2.5. Thermorésistance et production des spores | 30 |
| I.2.6. Pathogénicité et risques liées à <i>B. cereus</i> dans l'industrie agroalimentaire (IAA)..... | 30 |
| I.3.Généralités sur <i>Bacillus cereus</i> | 33 |
| I.3.1. Définition des <i>B. cereus</i> | 33 |
| I.3.2. Caractères généraux sur <i>Bacillus. Cereus</i> | 33 |
| II.1. Matériel Et Méthodes..... | 37 |
| II.1.1. Enquête descriptive..... | 37 |
| II.1.2. Description de la région d'étude | 37 |
| II.1.3. Echantillonnage, prélèvement et transport des échantillons des épices | 38 |
| II.1.4. Recherche, isolement et dénombrement de <i>Bacillus cereus sensu lato</i> | 39 |
| II.1.4.1. Préparation des échantillons et les dilutions des épices | 39 |
| II.1.4.2. Incubation et Isolement de <i>Bacillus cereus sensu lato</i> | 40 |
| II.1.5. Production et conservation des spores de <i>Bacillus cereus sensu lato</i> | 40 |
| II.1.5.1. Préparation de pré-cultures sensu lato | 40 |
| II.1.5.2. Confirmation de l'authentification d'appartenance au groupe <i>B. cereus</i> | 40 |
| II.1.5.3. Préparation des stocks de spores | 41 |
| II.1.5.4. Récupération et lavage de spores..... | 41 |

| | |
|---|----|
| II.1.6. Expression des résultats du dénombrement en UFC/g..... | 42 |
| II.2. Résultats Et Discussions | 45 |
| II.2.1 Obtention des isolats de <i>B. cereus sensu lato</i> | 45 |
| II.2.2. Prévalence et dénombrement de <i>B. cereus sensu lato</i> des épices utilisées | 46 |
| II.2.2.1. Prévalence de <i>B. cereus sensu lato</i> dans les échantillons analysés | 46 |
| II.2.2.2. Dénombrement du groupe <i>B. cereus</i> dans les échantillons d'épices analysées... | 47 |
| II.2.2.3. Prévalences de différents endroits de prélèvements | 49 |
| II.2.3. Production et conservation des spores de <i>Bacillus cereus sensu lato</i> | 49 |
| II.2.3.1. Les pré-cultures des <i>Bacillus cereus</i> | 49 |
| II.2.4 Purification des isolats de <i>B. cereus sensu lato</i> | 50 |
| II.2.4.1. Récupération des culots de spores | 50 |
| Conclusi..... | 53 |
| Références Bibliographiques :..... | 56 |
| Annexe | |

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

Aw : Activity Water.

AQR : Appréciation Quantitative de Risque.

BHIH: Brain Heart Infusion Broth.

Cyt k: Cytotoxine K.

DO : Déclaration Obligatoire.

DPA : Acide Dipicolinique.

FAO : Food Agriculture Organisation of the United nations

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point.

Hbl : Hémolyse bl.

IAA : Industrie Agroalimentaire.

ICMSF : Commission Internationale des spécifications.

InVS : Institut de veille sanitaire.

MYP: Mannitol egg Yoek Polymixin.

Nhe : Entérotoxine Non Hémolytique.

TIAC : Toxi-infection Alimentaire collective.

TSE : Tryptone Sel Eau.

UFC : Unité Formant Colonie.

UNIDO : Organisation des Nations Unies pour le développement Industriel.

Liste des figures

| N° | Titre | P |
|----|---|----|
| 01 | Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases. | 19 |
| 02 | Description des points de prélèvements des échantillons des épices et des herbes séchées de la région de Laghouat | 38 |
| 03 | Echantillonnage des épices. | 39 |
| 04 | Préparation des dilutions décimales des échantillons des épices après traitement thermique de 80°C. | 40 |
| 05 | a) Récolte des spores de <i>B. cereus</i> ; b) récupération et la mise en suspension des spores | 41 |
| 06 | Préparation et lavage de stock de spores. | 42 |
| 07 | Comptage des colonies après incubation sur milieu Mossel. | 43 |
| 08 | Isolat de <i>Bacillus cereus</i> sensu lato sur gélose Mossel à émulsion de Jaune d'œuf. | 45 |
| 09 | Concentrations de <i>Bacillus cereus</i> sensu lato en (Log Ufc/g). | 49 |
| 10 | Observation macroscopique des pré-cultures de <i>B. cereus</i> , tube a) milieu liquid BHIB avant incubation ; b) croissance des <i>B. cereus</i> se manifeste par un trouble microbien | 49 |
| 11 | Des cultures pures des isolats de <i>B. cereus</i> . | 50 |
| 12 | Obtention de stocks de spores de <i>Bacillus cereus</i> sensu lato. | 50 |

Liste des tableaux

| N° | Titres | P |
|-----------|---|-----------|
| 01 | Classification sensorielle des épices selon (Peter, 2001) . | 23 |
| 02 | Représentatif de différents endroits de prélèvement des épices dans la ville de Laghouat. | 38 |
| 03 | Prévalences (%) de <i>B. cereus</i> sensu lato dans les épices utilisées dans la Wilaya de Laghouat. | 46 |
| 04 | Résultats du dénombrement (ufc/g) des spores de <i>B. cereus</i> sensu lato dans les épices utilisées dans la Wilaya de Laghouat. | 48 |

Résumé :

L'intoxication alimentaire est due à de nombreuses bactéries, y compris *Bacillus cereus*, qui est transportée par les épices ajoutées aux aliments, *Bacillus cereus* est connu pour être à l'origine de Toxi-infections alimentaire dans la restauration collective. Leurs spores sont très résistantes à des chaleurs élevées et peuvent survenir dans les aliments cuits, Ce travail vise à rechercher et dénombrer les spores du groupe *B. cereus* dans les épices et herbes séchés utilisés dans la région. En effet les 36 échantillons analysés ont montré des résultats de contamination très élevés. Tandis que les résultats varient entre 10^4 et 10^6 c'est ce qui explique l'état critique de ces échantillons.

En effet ce travail présente un intérêt dans l'évaluation du risque lié à la consommation de ces produits et leur qualité microbiologique.

Mots clés : Spores, *B. cereus*, épices et herbes séchés, toxi-infection alimentaire.

Abstract :

Food poisoning is caused by many bacteria, including *Bacillus cereus*, which is carried by spices added to foods, *Bacillus cereus* is known to be the cause of food poisoning in catering. Their spores are very resistant to high heat and can occur in cooked foods. This work aims to search for and enumerate the spores of the *B. cereus* group in the spices and dried herbs used in the region. Indeed the 36 samples analyzed showed very high contamination results. While the results vary between 10^4 and 10^6 explain the critical state of these samples.

Indeed, this work is of interest in assessing the risk associated with the consumption of these products and their microbiological quality.

Key words: Spores, *B. cereus*, dried spices and herbs, food poisoning.

المخلص:

يحدث التسمم الغذائي بسبب العديد من البكتيريا ، بما في ذلك *Bacillus cereus* ، التي تحملها التوابل المضافة إلى الأطعمة ، ومن المعروف أن *Bacillus cereus* هو سبب التسمم الغذائي في تقديم الطعام. إن أبعادها شديدة المقاومة للحرارة العالية ويمكن أن تتواجد في الأطعمة المطبوخة ، ويهدف هذا العمل إلى البحث عن جراثيم مجموعة *B. cereus* في التوابل والأعشاب المجففة المستخدمة في المنطقة وتعدادها. وبالفعل أظهرت 36 عينة تم تحليلها نتائج تلوث عالية جدا ، بينما اختلفت النتائج فيما بينها 10^4 و 10^6 يشرح الحالة الحرجة لهذه العينات.

في الواقع ، هذا العمل مهم في تقييم المخاطر المرتبطة باستهلاك هذه المنتجات وجودتها الميكروبيولوجية.

الكلمات المفتاحية: الجراثيم، بكتيريا سيريس ، توابل وأعشاب مجففة ، تسمم غذائي.

Introduction

générale

Introduction générale

La diversité des aliments pour chaque région est caractérisée par sa propre nourriture, les plats traditionnels, mijotés, les soupes, sauces. Marinades, salades, barbecues ... et toutes sortes de recettes, cependant ils partagent tous l'utilisation des épices et les herbes séchées.

Ces condiments sont responsables d'assaisonnement, du goût de la saveur, et même de couleur, ils améliorent la qualité sensorielle et peuvent changer le destin d'un plat (**Peter, 2001**). Les épices et les herbes aromatiques sont des dérivés des végétaux qui sont récoltés de différentes parties de plantes (**Herman, 2015**).

Les épices sont souvent séchées (**UNIDO et FAO, 2005**), ont donc également une activité d'eau (Aw) très faible, ce qui empêche la prolifération des microorganismes. Par ailleurs les épices peuvent contenir des moisissures et des bactéries sporulées qui peuvent survivre dans diverses conditions de stress (**Daou et al., 2009 ; Fedhila et al., 2006**) et dans des conditions de faible humidité notamment un groupe de bactéries qui s'appelle *Bacillus cereus* (**Ainiza, 2011**).

Les *Bacillus Cereus* peuvent générer des altérations lorsque qu'elles sont ajoutées à des produits alimentaires à forte teneur en eau par le développement rapide des *Bacillus cereus* (**Garcia et al., 2001**). Les spores persistent à la chaleur de cuisson à cause de son caractère de Thermorésistance (**Meyer et al., 2004**). Après préparation lorsque les conditions favorables reviennent et durant le stockage (chaîne du froid et du chaud) jusqu'à l'assiette du consommateur, les spores se réactivent et déclenchent le processus de germination (**Anonyme, 2007**). Alors le nombre des bactéries augmente de manière significative (**Schweiggert et al., 2004**). Et atteignent des niveaux critiques des doses supérieures à 10^5 UFC/ g (**Kramer et Gilbert 1989 ; Becker et al., 1994**). Cette dose est capable de provoquer des intoxications alimentaires (TIA) (**Anses, 2011**). En produisant une toxine responsable des formes émétiques préformée dans les aliments (très résistantes) et diarrhéiques directement dans l'intestin grêle (**Hoton et al., 2009 ; Guinebretière et al., 2013**).

Ce travail vise à rechercher, dénombrer et quantifier les spores du groupe *Bacillus cereus* dans les épices et les herbes séchées dans la région de Laghouat, pour évaluer le risque lié à la consommation de ces produits.

Pour atteindre les objectifs souhaités on suivra la linéature suivante : commençant par une enquête descriptive, un échantillonnage des épices, isolement et dénombrement, des tests d'authentification d'appartenance au groupe *B. cereus*. Enfin production et conservation des spores.

Dans ce manuscrit le travail sera réparti en deux grandes parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique représentée par deux chapitres :
 - ✓ Le premier chapitre est réservé pour étudier la Microbiologie prévisionnelle, ses applications et ses modèles.
 - ✓ Le deuxième chapitre est scindé en trois grands titres : Généralités sur les épices et condiments, la relation entre le couples ‘Aliment-Microorganisme’, et finalement généralités sur *Bacillus cereus* et ses importants caractères.
- La deuxième partie s’appuie sur la démarche et la méthodologie utilisée au sein de laboratoire afin de mettre en œuvre le travail de recherche cité ci-dessous et présenter des résultats et les interpréter.

En fin une conclusion ou un récapitulatif tend à donner un jugement final sur le sujet.

Synthèse

bibliographique

I.1. Revue sur

la microbiologie prévisionnelle

I.1. Revue sur la microbiologie prévisionnelle

La microbiologie prévisionnelle est un outil très utile qui présente des applications concrètes en industrie, permet d'accélérer le développement de nouveaux produits et également d'évaluer les mesures de maîtrise et la sécurité d'un aliment. Il est donc nécessaire de bien caractériser le couple aliment/microorganisme. Elle permet donc de prévoir l'impact de différentes conditions environnementales (température, de pH, d'activité de l'eau) par des modèles mathématiques (**Augustin et al., 2005. Membré et al., 2005**).

De concentration en acides organiques et en inhibiteurs (**Coll Cardenas et al., 2008**) et de leurs interactions éventuelles (**Augustin et al. 2005**) sur la croissance, l'inactivation ou la survie des microorganismes (**Buchanan and Whiting 1996 ; McMeekin et al. 1993**).

Des modèles spécifiques ont ainsi été développés pour prévoir d'une part la croissance microbienne, et d'autre part la décroissance ou l'inactivation et ce pour les germes pathogènes (**Shimoni and Labuza, 2000**) ou pour les germes d'altération (**Koutsoumanis, 2009**). Historiquement ce sont les modèles d'inactivation thermique qui ont été utilisés en premier notamment pour caractériser les barèmes de stérilisation et de pasteurisation.

La microbiologie prévisionnelle de croissance s'est ensuite rapidement imposée pour prévoir l'évolution des micro-organismes depuis la fourche jusqu'à la fourchette en intégrant les différentes sources de variabilité et d'incertitude liées à la matière première, aux micro-organismes (**Membré et al., 2005**), aux différentes opérations unitaires du procès de fabrication, au mode d'emballage et aux divers scénarii thermiques rencontrés par l'aliment jusqu'à l'assiette du consommateur.

Pour cela, la microbiologie prévisionnelle se base sur trois familles de modèles. La première famille est celle des modèles primaires, modèles secondaires, et celle de tertiaires.

I. 1.1 Application, maîtrise et intérêts de la microbiologie prévisionnelle

La microbiologie prévisionnelle a pour but de prédire l'évolution des microorganismes dans les aliments par des modèles mathématiques des outils pour assurer la sécurité microbiologique des aliments établir les flux de contamination dans une chaîne alimentaire, développer et assister les systèmes d'assurance qualité. Elle permet d'avoir un meilleur contrôle des dangers microbiologiques.

Le but de synthèses est de donner une vue d'ensemble sur des modèles de microbiologie prévisionnelle et leur application. Plusieurs communications ont été réalisées afin de montrer l'intérêt que peut avoir la microbiologie prévisionnelle dans l'évaluation des risques liés à la

présence de micro-organismes pathogènes dans les aliments (**Augustin et Carlier, 2002b ; Augustin, 2003a Augustin, 2003b Augustin et Carlier, 2004**). L'objectif de ces communications était de montrer l'intérêt des modèles de prévision du comportement microbien pour mesurer objectivement l'impact relatif que peuvent avoir différentes options de gestion sur la maîtrise des risques. ...

-L'utilisation de la microbiologie prévisionnelle peut concerner (**Brul et al., 2007**).

-Les plans HACCP (Hazard Analysis - Critical Control Point).

-L'Appréciation Quantitative de Risque (AQR) (estimation de l'évolution du nombre de micro-organismes dans une chaîne de production, évaluation de l'exposition à une bactérie pathogène, conséquences de cette exposition).

-La détermination de la durée de vie d'un aliment, la prédiction de la croissance de micro-organismes pathogènes ou d'altérations sur un aliment déterminé.

-Le développement d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé (par exemple, l'évaluation d'une nouvelle technologie de production).

-La mise au point d'une nouvelle formulation d'un produit sur l'évolution des micro-organismes).

-La formation du personnel (formation des personnes directement responsables de la qualité microbiologique du produit).

-La planification d'expériences (définition des intervalles entre chaque échantillonnage et nombre d'échantillons à prélever).

I.1.2. Classification de modèles de la microbiologie prévisionnelle

La microbiologie prévisionnelle vise à prédire et de contrôler l'évolution microbienne, et assure la sécurité du consommateur de la fabrication jusqu'à l'assiette du consommateur (**Membré et al., 2005**) par le biais des modèles mathématiques. Chacun des modèles présentes des avantages et des inconvénients qu'il est important de prendre en compte pour assurer l'utilisation optimale des modèles.

I.1.2.1 Modèle primaire de croissance

Whiting et Buchanan [1993] ont proposé trois classes de modèles : les modèles primaires, secondaires et tertiaires.

Les modèles primaires décrivent l'évolution au cours du temps de la population microbienne dans un environnement spécifique ou permettent de simuler le comportement des micro-organismes en fonction du temps et permettent de décrire la courbe de croissance microbienne avec ses quatre paramètres : la contamination initiale N_0 , le temps de latence lag, le taux de croissance maximal μ_{max} et la densité de population maximale N_{max} (**Ross and McMeekin 2003**). Les modèles primaires les plus utilisés sont les modèles de (**Baranyi and Roberts 1994**).

La mesure de cette population peut être directe (exemples : dénombrement sur boîtes de Pétri, cryométrie en flux ou sur filtre avec analyse d'image) ou indirectes (exemples : dosage de certaines composantes témoins du métabolisme bactérien comme ATP-métrie, dosage du glucose, du CO_2 . etc.). Selon leur complexité.

Les modèles primaires sont caractérisés par un ou plusieurs paramètres comme le temps de latence, le taux de croissance, la densité maximale etc. Ces paramètres sont spécifiques à des conditions d'environnement constant au cours du temps. Les modèles décrivant l'effet des conditions d'environnement (par exemple : pH, Température, acides) sur les paramètres des modèles primaires sont appelés (modèles secondaires). (**Whiting et al., 1993**). Pour faire le lien entre les modèles primaires et secondaires en utilisant les systèmes experts et de bases de données sont appelés (modèles tertiaires).

En parallèle à cette classification, on peut définir des modèles dynamiques permettant de prédire la croissance microbienne en fonction des paramètres des modèles primaires qui varient au cours du temps (conditions d'environnement variant au cours du temps) (**Sanaa, 2002**).

Il existe plusieurs modèles mathématiques : (le modèle exponentiel **Buchanan et al. (1997)** ; le modèle de **Zamora et Zaritzky en 1985** ; modèles logistique et Gompertz **Gibson et al. [1987]** ; Les modèles classiques **Zwietering et al. [1990]** ; le modèle de Baranyi (**Baranyi et al., 1994**).et le modèle logistique avec délai de rupture (**Rosso et al.) en 1995** en appuyant sur les plus importants.

a. Le modèle de Baranyi

Le modèle Baranyi est très utilisé car il donne des résultats satisfaisants lors d'ajustement de modèles sur des données de laboratoire.

Baranyi et al. [1993] ont proposé un modèle combinant la fonction de freinage logistique et une cinétique du passage des cellules de la phase de latence à la phase de croissance exponentielle. Ce modèle est basé sur une équation différentielle (phase exponentielle) et complété par deux fonctions d'ajustement.

La première fonction d'ajustement décrit la phase de transition entre la phase de latence et la phase exponentielle. La seconde fonction d'ajustement permet de décrire la phase d'inhibition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire.

Elle est basée sur le principe d'une diminution progressive des nutriments pour des raisons pratiques d'ajustement de modèle, le modèle de Baranyi fut réécrit en un modèle utilisant des variables explicites (**Baranyi et al., 1994**).

b. Le modèle logistique avec délai de rupture

(**Rosso et al.**) en 1995 a proposé le modèle logistique avec délai de rupture. Il est le modèle le plus simple et un des plus utilisés actuellement. Il suppose qu'il n'y a pas de possibilité de croissance lors de la phase de latence et qu'il n'y a pas de transition entre la phase de latence et la phase exponentielle. Le modèle prend l'expression suivante :

$$\ln[N(t)] = \begin{cases} \ln(N_0) & \text{si } t \leq \lambda \\ \ln(N_{max}) - \ln \left[1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1 \right) e^{-\mu(t-\lambda)} \right] & \text{si } t > \lambda \end{cases}$$

Voilà la (**Figure 1**) décrit la courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases.

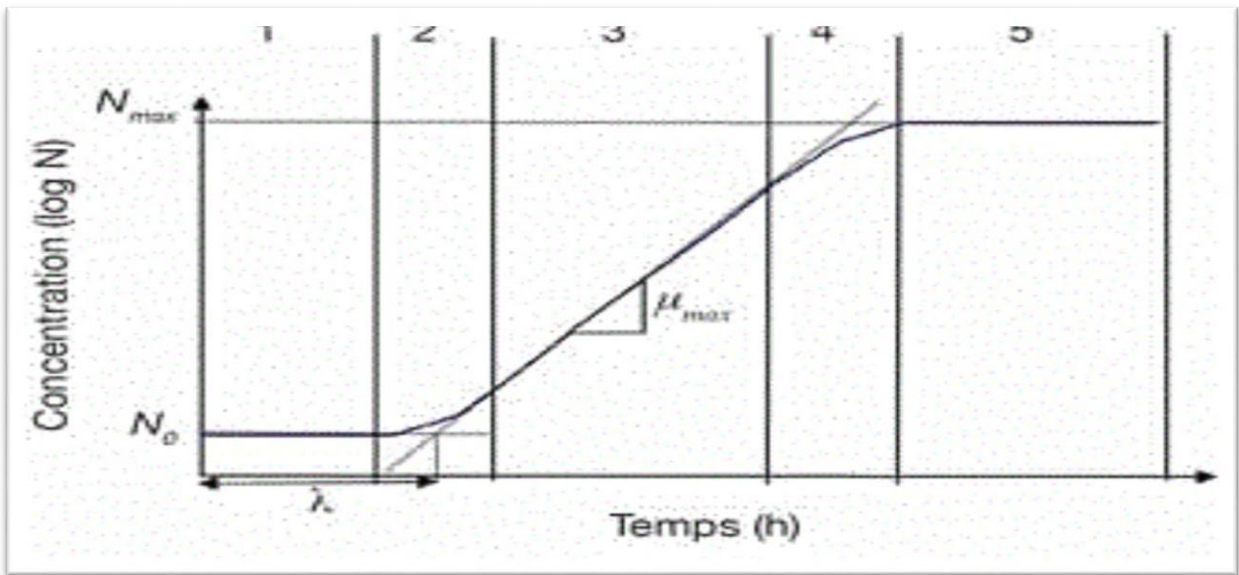


Figure 01 : Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases

Les différentes phases de la courbe :

- La phase de latence (λ) : cette phase correspond à l'adaptation de l'inoculum (N_0) à son nouvel environnement. Durant cette période, la vitesse de croissance est nulle ($\mu = 0$).
- La phase d'accélération : les bactéries commencent à se multiplier pour atteindre progressivement la vitesse maximum de croissance (μ_{max}) ($0 < \mu < \mu_{max}$).
- La phase exponentielle : la vitesse de croissance des bactéries est maximum ($\mu = \mu_{max}$).
- La phase de décélération : la vitesse de croissance devient progressivement nulle ($\mu_{max} > \mu > 0$).
- La phase stationnaire : la vitesse de croissance est nulle ($\mu = 0$) et la culture atteint sa densité maximale ($N = N_{max}$) avec parfois une phase ultérieure de décroissance de la population.

I.1.2.2. Modèles secondaires de croissance

Ce modèle exprime la relation entre les paramètres des modèles primaires (taux de croissance par exemple) et un ou plusieurs facteurs d'environnement et permettent aussi de décrire l'effet des conditions environnementales sur les paramètres du modèle primaire (**Whiting et al., 1993**). Les facteurs de l'environnement agissant sur la croissance peuvent être classés dans deux groupes :

- Environnement abiotique : température, taux d'oxygène, structure de l'aliment, substances antimicrobiennes, nitrites, acides organiques, etc.
- Environnement biotique : compétition entre différentes espèces microbiennes, production d'inhibiteur spécifique, altération du milieu, état physiologique de l'inoculum, etc.

Les facteurs agissant sur la croissance les plus étudiés sont la température, le pH et l'activité de l'eau (a_w). Appuyant essentiellement aux effets de ces facteurs sur le taux de croissance exponentielle. On distingue ainsi deux approches : la première consiste à étudier l'impact de chaque facteur sur la croissance microbienne, la deuxième à étudier simultanément un ou deux facteurs en même temps.

Voici quelques exemples de modèles secondaires appliqués au taux de croissance et au temps de latence.

a. Modélisation du taux de croissance

Les principaux modèles décrivant l'évolution du taux de croissance ont la forme suivante :

$$\sqrt{\mu} = g(\beta, X)$$

Où g : est une fonction reliant les facteurs d'environnement pris en compte (X)

β : Les paramètres du modèle secondaire.

La transformation racine carrée permet d'améliorer la qualité d'ajustement en stabilisant la variance.

Les modèles secondaires ont déjà fait l'objet de travaux de synthèse (**Ross et al., 2003a**).

La section suivante donne un aperçu sur les modèles secondaires de croissance.

Les principaux modèles sont : Le gamma concept (**Zwietering et al., 1992**) ; Modèles de type racine carrée **Ratkowsky et al. [1983]** ; Modèle cardinal (**Le Marc et al., 2002** ; **Van Derlinden et al., 2008**) ; et les modèles polynomiaux (**Luning et al., 2007**).

b. Modélisation du temps de latence

Le temps de latence est un paramètre très difficile à estimer. Il présente une très grande variabilité **Buchanan et al. (1990)** ont défini le temps de latence en calculant la dérivée seconde du modèle primaire de Gompertz, le temps auquel l'accélération de la croissance est maximale correspond au temps de latence.

Le temps de latence ne dépend pas uniquement de l'environnement actuel, mais aussi de l'environnement précédent et de l'état physiologique des bactéries. De ce fait, le développement de modèles secondaires pour prédire le temps de latence est compliqué. Deux approches ont été adoptées pour modéliser le temps de latence :

La première considère que le temps de latence et la vitesse de croissance doivent être modélisés séparément (**Ratkowsky et al., 1982**), la deuxième considère que le temps de latence est proportionnel au temps de génération des bactéries car celles-ci doivent réaliser une certaine quantité de travail pour s'adapter à leur nouvel environnement (**Robinson et al., 1998**).

I.1.2.3. Modèles tertiaires

Ces modèles utilisent des systèmes experts et des bases de données pour faire le lien entre les modèles primaires et secondaires (modèle combinant), les modèles utilisant un logiciel ou un système expert sont donc constitués d'une base de données permettant de sélectionner la matrice alimentaire et les micro-organismes d'intérêt. À partir de ces données un modèle tertiaire permet de prédire l'évolution de ce micro-organisme dans des conditions environnementales différentes.

1.2. Généralités

Sur les épices

I.2. Généralités sur les condiments et les épices

I.2.1. Définition et caractéristiques des épices

Les épices sont définis comme un grand nombre de produits végétaux ou de mélanges de ceux-ci utilisé pour aromatiser, améliorer le parfum et d'autres sensations propriétés des aliments (Peter, 2001).

Les épices sont classées selon les parties des plantes dont ils sont dérivés, tels que les graines (par exemple, l'anis, le carvi et la coriandre), les fruits (par exemple, les poivrons et la cardamome), baies (p. ex. poivrons et piment de la Jamaïque), fleurs (p. ex. camomille), feuilles (herbes) (par exemple, laurier, basilic, menthe poivrée, origan et thym), les racines par exemple (le raifort) et les rhizomes (par exemple, le gingembre). Diverses épices nécessitent des méthodes de récolte et de post-récolte très diverses (Fogele et al., 2017).

Aussi peuvent être classées selon leur propriétés taxonomique (Jessica et al., 2015) et (Peter, 2001).

A propos de leur qualité sensorielle et selon (Peter, 2001), ont été classés comme montre le (tableau01), cette classification était faite selon plusieurs fonctions saveur, couleur et leur goût c'est à dire :

- ❖ Epices chaudes.
- ❖ Epices douces (légères).
- ❖ Epices et herbes aromatiques.

Ces assaisonnements sont chimiquement et histologiquement groupe hétérogène de produits qui sont importants articles du commerce international. Leurs extraits et oléorésines sont généralement reconnus comme des aliments sûrs.

Historiquement les épices et les herbes sont utilisés depuis des siècles caractéristiques d'arôme et de saveur qu'ils fournissent aux aliments. Dans les temps anciens, lorsque la conservation des aliments était insuffisante. (Larousse, 2012).

Tableau 01 : Classification sensorielle des épices selon (Peter, 2001)

| Classe | Epices |
|---------|--|
| Chaudes | Poivrons noirs, blancs, poivre de Cayenne, piment (capsicum), gingembre et moutarde. |

| | |
|-------------------------------------|--|
| Douces | Paprika et Coriandre. |
| Epices et herbes aromatiques | Cumin, cannelle, piment, cardamome, basilic, clou de girofle , laurier, noix de muscade... |

I.2.2. La microbiologie des épices

Les épices et les herbes peuvent contenir un grand nombre de micro-organismes (**Frazier et Westhoff, 1978 ; Guarino et Pepler, 1976**). Alors On prend le Poivre noir, curcuma, paprika, piment de la Jamaïque et marjolaine sont les épices les plus fortement contaminées par des bactéries aérobies que les bactéries anaérobies.

Pour certains secteurs de l'industrie de transformation des aliments (par exemple, mise en conserve), la contamination des ingrédients par des spores bactériennes sont particulièrement gênantes, le microbiote des principaux composants d'organismes relativement sensibles à la chaleur. Cependant, même si un mineur ingrédient, par exemple une épice naturelle, contribue fortement des micro-organismes résistants à la chaleur tels que les spores bactériennes termes du processus appliqué, alors cet élément devient le seul composant le plus important déterminant la bactériologie du produit et contrôle du produit fini implique le contrôle de la charge de spores de cet ingrédient (**farkas, 2014**).

Dans de nombreuses épices, la majeure partie de la charge microbienne est composée de spores mésophiles (aérobies), bactéries sporiformes (par exemple. *Bacillus subtilis*. *Bacillus licheniformis*. *Bacillus megaterium*. *Bacillus pumilus*. *Bacillus brevis*. *Bacillus polymixa* et *Bacillus cereus*), car de nombreux végétaux les cellules meurent pendant la phase de séchage tandis que les spores survivent.

On trouve occasionnellement des anaérobies et aérobies thermophiles, parfois en nombre modéré. Ainsi, certaines épices sont des sources potentielles de spores bactériennes

Hautement résistantes à la chaleur. En ce qui concerne les bactéries non performantes, les coliformes sont également souvent trouvés, aussi que la présence de *salmonelle* (**Pafumi, 1986**).

Généralement les bactéries psychrotrophes sont moins nombreuses en épices et en herbes que ceux mésophiles. La contamination par les moisissures peut également être un contaminant important de Poivre blanc, poivre noir, piment et coriandre semblent être le plus fortement

contaminés par des moisissures, *Aspergillus glaucus* group, *Aspergillus niger* et *Penicillium spp.* Sont normalement répandus. Les moisissures peuvent se développer sur les épices et les herbes avant le séchage ou pendant le séchage, le stockage et l'expédition. Des levures ont été trouvées dans les épices en faible nombre seulement. (Farkas, 2014).

Il existe de nombreuses études qui ont été menées sur la contamination microbienne des épices comme :

Une étude basée au Nigeria. Un total de 230 échantillons de piment, poivron rouge, poivre noir, thym et curry la poudre a été collectée sur les principaux marchés de Port Harcourt, Nigeria et examiné pour les charges bactériennes et contamination par *Bacillus*. Le nombre total variait de 1.8×10^4 à 1.1×10^8 bactérie / g. La plupart des épices testées auraient des charges élevées de *Bacillus cereus*. Important nombre de *B. polymyxa*, *B. subtilis* et *B. coagulans* ont été également détecté. (ANTA1 et al., 1988).

Une autre étude a déterminé la distribution des micro-organismes dans les poivrons noirs moulus et entiers, poivrons blancs moulus et entiers, romarin moulu et entier, et basilic moulu. Dix-neuf échantillons au total des neuf épices auraient été obtenues auprès de sociétés japonaises locales et avaient été importé de plusieurs pays non identifiés. Le nombre de bactéries variait de 4.6×10^7 Ufc/ g pour le sol. Poivre noir à 4.6×10^4 Ufc / g pour le poivre blanc moulu. Le nombre de coliformes variait de 7.5×10^1 Ufc / g pour l'un des échantillons de curcuma moulu à 2.0×10^6 ufc / g pour un échantillon de poivre blanc entier (Juri et al., 1986).

1.2.3. La relation entre le couple (Microorganisme-Aliment)

a. La relation entre aliments et *Bacillus cereus*

Les épices et les herbes séchées sont utilisés partout pour préparer des aliments. En raison des conditions climatiques de séchage et de stockage la qualité de ces condiments susceptible d'être affectée par le contact avec l'air (Baiba et al., 2017) Ce type alors est très sensibles à la contamination par des moisissures et des bactéries sporulées. En particulier les *Bacillus Cereus*, sont considérées parmi les bactéries les plus résistantes au séchage qui peuvent survivre dans des conditions défavorables (Schaarschmidt et al., 2016).

Les herbes et le épices peuvent générer des altérations lorsque qu'ils sont par le développement rapide des *Bacillus cereus*.

On pourrait alors supposer que ces additifs sont porteurs des bactéries lorsqu'ils sont cuits et ajoutés à des produits alimentaires à forte teneur en eau (Garcia et al., 2001) alors les

aliments sont contaminés par le biais des épices Car elles sont la principale source de sporulation.

Les spores de **B. cereus** dans la restauration collective de grands volumes d'aliments préparés à l'avance et conservés à température ambiante ou mal réfrigérés, et rapidement réchauffés avant consommation elles germent et se multiplient rapidement ce qui génère des altérations et atteindre des niveaux infectieux (**Pafumi, 1986**), et produisent de toxines (**Ehling-Schulz et al., 2004**).

Donc le comportement de *B. cereus* à différentes étapes de la vie d'un produit alimentaire dépend du type de préparation et de conservation de l'aliment ainsi que le non-respect de la chaîne du froid pourraient avoir été les causes de ces contaminations, exemple

La conservation au froid peut permettre la multiplication de souches psychrotolérantes de *B. cereus*. (**Levy, 2010**).

Différents d'autres facteurs peuvent fortement altérer des aliments, on peut les classer selon leurs caractères intrinsèques ou extrinsèques.

a.1. Les facteurs qui commandent le développement de *B. cereus* dans l'aliment

Il existe plusieurs paramètres, on cite les plus importants.

- **Facteurs intrinsèques :**

(Les facteurs intrinsèques sont relatifs à l'aliment)

- Teneur en sel :**

Raevuori et Genigeorgis en (1975). Mossel et al. (1967) et Peters et al. (1991), ont observé une croissance à toutes les températures examinées (14 C à 41 C) à la concentration en Na Cl de 0.5 avec pH 4.7 comme pH minimum de croissance

- Aw :**

Les microorganismes ont besoin de l'eau pour se multiplier. Ce paramètre correspond au rapport de :

$A_{eau} = \frac{Peau\ aliment}{Peau\ pure}$. L' a_w eau varie entre 0 et 1.

Les microorganismes capables de se développer dans des produits à faible teneur en eau sont qualifiés de xérophiles, ceux en milieux fortement sucrés ou salés respectivement d'osmophiles et de halophiles (**CUQ, 2007**).

Aw minimale de 0.93, avec croissance à 72 heures en bouillon TGE, alors qu'aucune croissance observée pour Aw de 0.92 en bouillon BHI (ICMSF, 1996).

-PH :

Le pH minimal de croissance varie dans les aliments de pH 4.5 à pH 5.15.

Bien que le maintien à pH ait prolongé la phase de latence, on observe alors une croissance rapide de *Bacillus cereus* (Sutherland et al.)

La valeur du pH minimum de croissance égale à 4.9 et le pH maximum de croissance est de 9.3 (Sutherland et al., 1996).

Dans les aliments dont le pH est compris entre 4.5 et 9.5, de nombreuses altérations sont susceptibles de se produire et la plupart des bactéries pathogènes cultivent dans ces conditions. (CUQ, 2007).

-Le potentiel d'oxydo-réduction :

Selon le mode de respiration des microorganismes ; sont soit aérobies stricts, soit anaérobies stricts, soit Aero-anaerobie, soit micro-aérophiles.

Ces propriétés expliquent la diversité des altérations que l'on peut rencontrer.

Dans les aliments, on peut considérer la présence ou l'absence d'oxygène comme un paramètre fondamental vis à vis des microorganismes (CUQ, 2007).

• **Facteurs extrinsèques :**

(La température, les additifs, les radiations...).

Sont intimement liés à l'aliment et influencent la stabilité des microorganismes qui sont présents dans le produit.

-La température :

Température optimale de croissance :

Selon (kramer et Gilbert, 1989)

La plupart des souches de *Bacillus Cereus* sont mésophiles ce que veut dire leur température optimale de croissance est voisine de 37 °C, on cite 28 C à 35 °C.

Température maximale de croissance :

La plupart des souches de *Bacillus cereus* se cultivent jusqu'à 55 °C. parfois au-delà (Johnson et al.,1983).

On cite de 35 °C à 50 °C (Kramer et Gilbert, 1989).

Température minimale de croissance :

Souches mésophiles :

La plupart des souches leurs températures minimales de croissance selon Jaquette et Beuchat peut aller de 6 °C à 10 °C.

Par contre (Kramer et Gilbert, 1989) ont cité 5 à 15° C comme température minimale de croissance.

Psychrotrophie et psychrotolérances

Certaines sont psychrotrophes leurs températures minimales de croissance selon les auteurs (Beuchat et al., 1997 ; Dufrenne et al., 1995 ; Francis et al., 1998 ; Joosten et al., 2005) est : < 7 °C. ou égale à 6 °C. ou encore \leq à 5 °C

Quand on parle de psychrotolérantes il s'agit de *Bacillus weihenstephanensis*, qu'elles peuvent se développer à 6 °C. et qu'il existe certainement des formes intermédiaires entre cette dernière et *Bacillus Cereus* (Stenfors et Granum, 2001).

Humidité relative

b. La relation entre *Bacillus cereus* et aliments

b.1. Origine et contamination des épices par *B. cereus*

Les pays tropical ou subtropical d'où proviennent les épices ont un climat très favorable au développement microbien notamment par *B. cereus* à cet effet on résultera des épices fortement contaminées (Shylaja et al., 2001).

La plupart des épices sont contaminées par la formation de spores par le genre *Bacillus* (Banerjee et Sarkar, 2004 ; Garcia et al., 2001 ; Witkowska et al., 2011).

La contamination des épices peut survient pendant le développement, la collecte, le stockage, la commercialisation par la poussière des marchés (Khan, 2012).

Le processus de production des épices c'est toute une chaîne qui peut avoir un niveau plus élevé de contamination (**Podolak et al., 2010**). Les épices ont été détectées parmi les catégories d'aliments réservoir de *B. cereus* (**Turner et al., 2006**).

B. cereus à la capacité de croître rapidement, à sporuler et à former des biofilms (**Bartoszewicz et al., 2008**). À cet effet les spores se retrouvent partout dans la nature et contaminent les aliments par le biais des matières premières végétales, ce qui présente un grand problème à la santé publique.

Le nombre de Bactéries peut se multiplier de manière horrible lors de l'ajout des épices aux aliments sans conservation ultérieure jusqu'à la consommation (**Schweiggert et al., 2004**).

I.2.4. Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) liées à *B. cereus*

TIAC est défini par l'apparition d'au moins deux cas d'infections similaires présentant une symptomatologie identique à caractère gastro-intestinale rapportés à une même origine alimentaire, les toxi-infections alimentaire collectives sont à déclaration obligatoire (DO) (**définition légale, 25 Haeghebaert et al., 2002**), et confirmées lorsque l'agent pathogène est isolé dans des restes alimentaires ou des repas témoins, les préparations réfrigérées précuites et les produits déshydratés ainsi pourraient contribuer à l'augmentation des TIAC à *B. cereus* (**Ehling- Schulz et al., 2004**).

Une TIAC est liée ainsi à l'utilisation de matière première contaminée cependant durant le procédé de transformation, au non-respect des conditions d'hygiène et des températures pendant le stockage et la préparation des produits alimentaires (chaîne du froid et du chaud) et à la non maîtrise des contaminations croisées pendant la manipulation des aliments (**ANSES, 2016**).

Le plus souvent causées par *Bacillus cereus* (23 % pour 2006-2008), et surtout liées à un temps trop long de maintien du produit alimentaire à température ambiante ou à des mauvaises conditions de remise en température (**Delmas et al., 2010**).

Ces bactéries sont ingérées sous forme de cellules végétatives ou sous forme de spores (**Clavel et al., 2004**), une fois dans l'intestin. Germent, se multiplient, et produisent des entérotoxines. Les symptômes apparaissent entre (5 h à 24 h) après ingestion, se manifestent par des douleurs abdominales et une diarrhée profuse (**Stenfors Arnesen et al., 2008**).

Ces symptômes sont généralement bénins (**Dierick et al., 2005 ; Lund et al., 2000 ; Messelhäusser et al., 2014 ; Naranjo et al., 2011 ; Tschiedel et al., 2015**). Et durent moins

de 24 h peuvent être confondus avec celles de *Clostridium perfringens* (Ehling-Schulz et al., 2004b).

I.2.5. Thermorésistance et production des spores

B. cereus produit des spores résistant à la chaleur, elles ne se détruit ni lors du réchauffage de l'aliment ni au pH acide de l'estomac, ni par les enzymes digestives (Alonzo et al., 2015). Elles survivent à la pasteurisation, à la déshydratation, et même forment des biofilms. La pasteurisation stimule les spores à croître à nouveau sous forme de cellules végétatives (Anonyme, 2007).

Cette Thermorésistance est lié à la structure de spores formées au cour du traitement thermique à déshydratation des spores au cours de maturation (Meyer et al., 2004). Et attribuée à la présence de l'acide dipicolinique (DPA), il est present seulement chez les spores (Prescott et al., 2006).

Ainsi que l'acide N-succinyl-glutamique se produit dès les premiers stades de la sporulation (Meyer et al., 2004).

I.2.6. Pathogénicité et risques liées à *B. cereus* dans l'industrie agroalimentaire (IAA)

Bacillus cereus représentait entre 1996 et 2005 la 4 quatrième cause de Tiac en France (Delmas et al., 1996).

L'union Européenne a signalé 413 cas avérés d'épidémies d'origine alimentaire associées à *B. cereus* (EFSA, 2016).

La commission internationale des spécifications microbiologiques des aliments (ICMSF, 1974) affirme que les épices sont de qualité inacceptable lorsque le nombre total de bactéries dépasse 6 log UFC / g. cela peut être responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC).

B. cereus peut produire six types de toxines : cinq entérotoxines et une émétique, elles peuvent êtres thermostables ou thermolabiles (Anses, 2011).

Actuellement, trois entérotoxines ont été décrites chez *B. cereus* (Hbl. Nhe. Cyt K)

Entérotoxines Hbl (hémolysine BL). Nhe (entérotoxine non hémolytique) sont des protéines composées de trois sous unités sécrétées indépendamment (Granum et al., 2005).

Cytotoxine K (Cyt K) est une protéine de 34 kDa (Granum et al., 2005), existe sous deux formes Cyt K 1 et Cyt K 2 cette dernière est moins toxique que la première (Anses, 2011).

Les intoxications d'origine alimentaires liées à *B. cereus* sont incriminées dans deux pathologies : un syndrome émétique et un syndrome diarrhéique (**Hoton et al., 2009 ; Guinebretière et al., 2013**).

a. Le syndrome diarrhéique

Les symptômes des maladies diarrhéiques se manifestent dans un temps varie entre (8 à 16 h) après ingestion d'un nombre élevé de *B. cereus* entre 10^5 et 10^7 CFU/g. également par des douleurs abdominales et des nausées (**Stenfors Arnesen et al., 2008**), et possédant une activité similaire à la bêta-toxine de *Clostridium perfringens* (**Granum et al., 2005**).

b. Le syndrome émétique

Le syndrome émétique se manifeste par des nausées et des vomissements après 30 min à 6 h d'ingestion (**Ehling-Schulz et al., 2004b**), et se caractérise par la rapidité de l'apparition des symptômes (similaires à ceux provoqués par *Staphylococcus aureus*), généralement sont bénins et disparaissent avant 24 h (**Mahler et al., 1997 ; Pósfay-Barbe et al., 2008**).

I.3. Généralités sur

Bacillus cereus

I.3. Généralités sur *Bacillus cereus*

I.3.1. Définition des *B. cereus*

Le genre *Bacillus* comprend une vingtaine d'espèces, mais on s'intéresse essentiellement à *Bacillus cereus*, elle fait partie du phylum des firmicutes (**Larpent, 2000**), et appartient à la famille des *bacillaceae*, selon (**Slepecky et Hemphill, 2006**).

Cereus est l'espèce qui a la plus grande signification dans l'industrie alimentaire et agent responsable de toxi-infection alimentaire (**Euzeby, 2003**).

Bacillus Cereus est largement distribuée dans la nature en particulier le sol (**Harwood, 1989**). Elle partage 99% de similarité avec *B. anthracis*, et *B. thuringiensis* par leurs synthèses génétiques d'ARN 16 s (**Ash et al., 1991**).

I.3.2. Caractères généraux sur *Bacillus. Cereus*

a. Caractères Morphologiques

Bacillus cereus est une bactérie à coloration Gram positive, en forme de bâtonnets (**Rajkowski et Bennett 2003 ; Montville et Matthews 2005**). De 1 à 3 µm de large pour 3 à 10 µm de long. observée en paires ou chainettes courtes de 1 à 1.2 µm (**Te Giffel, 1997 ; Christiasson et al.,1999**), Généralement mobile par ciliature péritriche (**Drobniewski, 1993**).

Dont les cellules végétatives mesurent de 3 à 5 µm de long pour un diamètre de 1 à 2µm (**Reed 1994 ; Carlin et al. ;2000**), produit des spores non déformantes (**Euzeby ;2003**).

b. Caractères Biochimiques

B. cereus est caractérisée par son type respiratoire l'Aero-anaerobie facultatif (**Logan et de De Vos 2009**), par une Catalase positive. Mannitol et Citrate négative. Nitrate positive ou sous forme réduite (**Max Bugnicourt, 1995**), et une oxydase variable, elle produise de l'hémolyse de type β sur une gélose à base de sang (donc dégradation de la lécithinase) (**Sutra et al.,1998**), elle fermente le glucose et hydrolyse la Gélatine (**Zwietering et al.,1996 ; Notermans et al.,1997**).

c. Caractères physiologique

B. cereus peut croitre dans une large plage de température, dont la température minimale de croissance et varie entre 10 à 20 °C, la température optimale pour les mésophiles est environ de 37 °C et en présence d'oxygène et la température maximale est de 40 à 45 °C (**Logan et De Vos 2009**).

La concentration maximale de sel tolérée par *B. cereus* pour la croissance serait de 7.5% **(Rajkowski et Bennett 2003)**.

Les *B. cereus* forment des endospores survivre à des conditions défavorables, résistent à des températures de 126 °C pendant 90 min **(Pillai et coll, 2006)**, les spores sont également plus résistantes aux radiations, chaleur et humidité que les cellules végétatives **(Jenson et Moir 2003)**.

Partie II

Etude Expérimentale

II.1. Matériel Et Méthodes

II.1. Matériel Et Méthodes

II.1.1. Enquête descriptive

Une enquête était réalisée sur les épices en différents endroits de la Wilaya de Laghouat. L'enquête tend à identifier les plats préparés au niveau de cette région, consiste à décrire les épices et herbes séchées les plus utilisés et, en appuyant sur la température et la durée de cuisson, notamment la durée du stockage avant et après cuisson, et finalement la réfrigération, avec le nombre des opérateurs est de (110).

L'enquête descriptive ne concernait pas uniquement la cuisine à domicile, l'étude a mené ainsi les comptines scolaires, les pizzerias, les restaurants...etc. Cette dernière a permet de contrôler la qualité microbiologique des condiments commercialisés et d'évaluer la sécurité du consommateur.

Les prélèvements des épices ont été effectuées selon le choix des opérateurs. Au totale 36 échantillons d'épices, dont les épices les plus utilisées tels que le Poivre Noir est en moyenne de (99%), le Cumin (85%), le Gingembre (53%). Par contre le Thym environ de (28%) le Paprika (7%) et épices de chawerma (2%) représentent les condiments les moins utilisés par rapport aux autres.

Les manipulations ont été réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie de département de Biologie, université " Ammar Telidji Laghouat ".

II.1.2. Description de la région d'étude

La wilaya de Laghouat est située au centre du pays à 400km au sud de la capitale Alger dans le Nord du Sahara au pied de l'Atlas saharien. Elle fait partie du groupe Hauts plateaux centre.

La wilaya est bordée par Tiaret –Ghardaïa (Nord-Sud). Djelfa et El-Bayad (Est- Ouest).

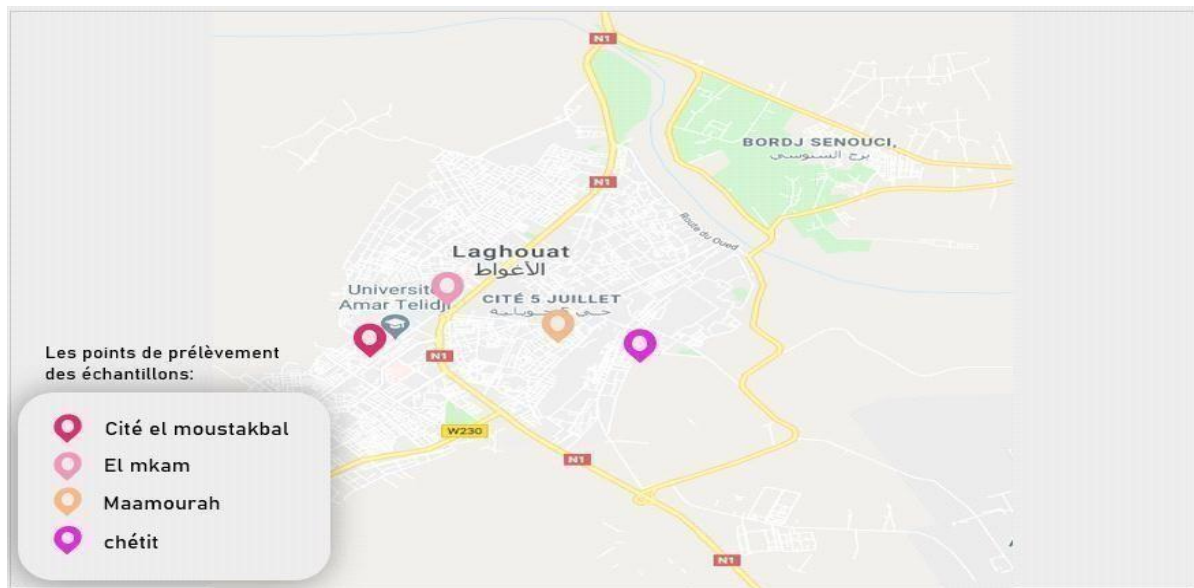


Figure 02 : Description des points de prélèvements des échantillons des épices et des herbes séchées de la région de Laghouat

II.1.3. Echantillonnage, prélèvement et transport des échantillons des épices

Le processus d'échantillonnage des épices sélectionnées pour cette application se déroulait dans le chef-lieu de la wilaya, et cela pour les deux types des épices existants (en vrac et conditionnées), prélevées auprès de nombreux herboristes (tableau 2), nous avons donc sélectionné un certains nombres d'épices de manière aléatoire et différente mais en quantités égales (10 g) pour chaque type d'épices sélectionnées.

Les échantillons prélevés ont été mis dans des pots stériles et transférés au laboratoire pour analyse dans une température ambiante et au même jour de prélèvement.

Tableau 02 : Représentatif de différents endroits de prélèvement des épices dans la ville de Laghouat.

| Endroits | Nombre d'échantillons |
|---------------------|-----------------------|
| Mammourah | 09 |
| Mkam | 10 |
| Chétit | 09 |
| (Cité elmoustakbal) | 08 |



Figure 03 : Echantillonnage des épices.

II.1.4. Recherche, isolement et dénombrement de *Bacillus cereus* sensu lato

La recherche et le dénombrement de *Bacillus cereus* ont été effectués selon la procédure d'AFNOR (1995).

II.1.4.1. Préparation des échantillons et les dilutions des épices

L'isolement des cellules de *Bacillus cereus* a été effectué à partir des matières premières des épices et des herbes séchées utilisés dans la région de Laghouat.

Sur des flacons de 90 ml du diluant (eau peptonée) (annexe01). Une quantité de 10g de chaque condiment a été pesée et déposée aseptiquement, cette dilution représente la dilution mère

Par la suite les flacons ont été emportés à l'agitation automatique (mélangeur stomacher) environ 10 à 15 min afin d'obtenir un mélange bien homogénéisé, ensuite la mise du mélange dans un bain marie à 80 °C pendant 10 minutes, puis directement sur un bain glacé pendant 30 s, ce traitement thermique permet d'exclure les formes végétatives et de cibler seulement les cellules bactérienne thermorésistantes, après traitement une série de dilution décimales successive (...) a été effectuée sur des tubes à visse de 9 ml avec le même diluant .

recherche de la catalase, en vérifiant la mobilité, le type respiratoire, et en fin l'hémolyse. (Voir annexes)

II.1.5.3. Préparation des stocks de spores

La procédure suivie selon **Gaillard et al. (1998)**.

Une gélose nutritive supplémentée par $MnSO_4$ et $CaCl_2$ (Annexe01) préparée au préalable puis était coulés sur des boites de pétries.

Ensuite un volume de 500 μ l de pré-culture qui a été ensemencée sur la surface des boites par technique de stries sérés.

En fin l'incubation a été faite à 37 °C de (5 à 7 jours).

II.1.5.4. Récupération et lavage de spores

Après un temps nécessaire à la sporulation bactérienne un tapi est formé, à l'aide d'une spatule stérile on récolte les spores, en raclant aseptiquement toute la surface de la gélose, les spores récupérées ont été mise en suspension dans des tubes à centrifuger de 15 ml de volume d'eau distillée stérile.



Figure 05 : a) Récolte des spores de *B. cereus* ; b) récupération et la mise en suspension des spores.

La suspension sporale préparée préalablement était centrifugée à 10000 g pendant 15 min. on jette le surnageant à chaque centrifugation puis relaver les culots à nouveau.

Afin de récupérer le culot de spores on renouvelle l'opération trois fois.

Après une série de lavage de (3 fois) on remet le culot récupéré dans un volume d'eau/éthanol à fin d'éliminer le reste des cellules végétatives. Ensuite le mélange était mis à 4 °C pendant 12 h.

Après 12 h les culots récupérés précédemment ré- déclenchent le processus des trois cycles de lavage en gardant les mêmes conditions de centrifugation et de volume d'eau distillée, les tubes doivent être agitées avec toute diligence en évitant la formation des floccs.

-Enfin et finalement le stock de spores obtenu était conservé à 4 °C [Ziane, 2014].



Figure 06 : Préparation et lavage de stock de spores.

II.1.6. Expression des résultats du dénombrement en UFC/g

Le dénombrement des colonies du groupe *Bacillus cereus* effectué à l'aide d'un compteur de colonies habituel.

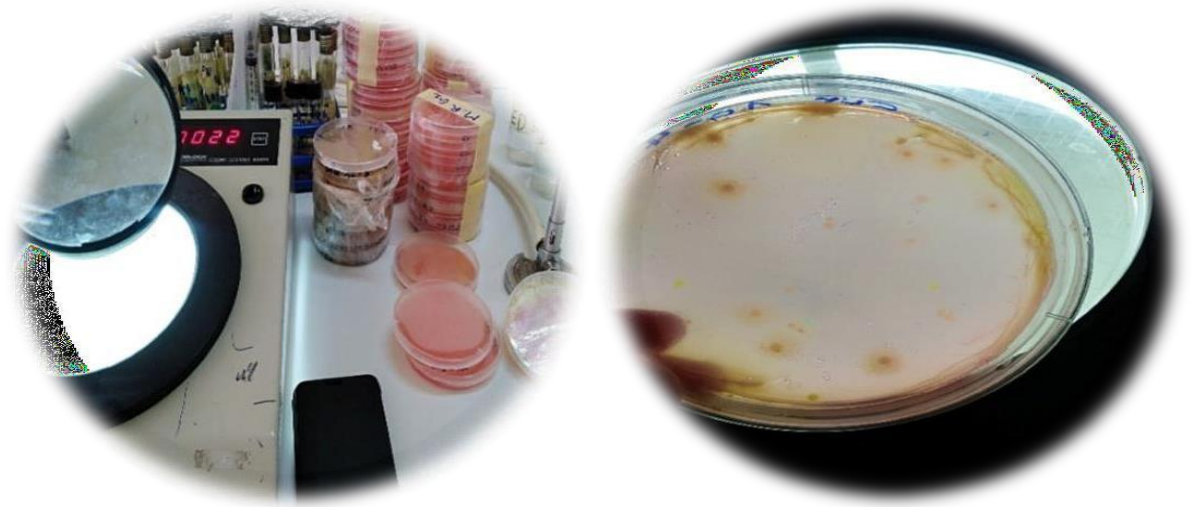


Figure 07 : Comptage des colonies après incubation sur milieu Mossel.

D'après **AFNOR. (1995)** les résultats seront exprimés de la manière suivante :

Avec :

ΣC : Somme d'unité formant colonies observées sur l'ensemble des boites n1 : nombre de boites retenues à la première dilution.

n2 : nombre de boites retenues à la seconde dilution.

d : taux de dilution correspondant à la plus faible dilution retenue. V : volume de la suspension étalée à la surface du milieu en (ml).

II.2. Résultats

Et Discussions

II.2. Résultats Et Discussions

II.2.1 Obtention des isolats de *B. cereus* sensu lato

Les isolats de *B. cereus* sensu lato étaient obtenus à partir des épices utilisées dans la région de Laghouat.

Après avoir soumis à un traitement thermique et élimination des cellules végétatives en gardant seulement les spores.

Les cultures ensemencées sur milieu Mossel à émulsion de jaune d'œuf (MYP) après incubation de 48 h à 30 °C. les colonies de *Bacillus Cereus* apparaîtront en rouge ou sont de couleur rose cela indique la non utilisation du Mannitol par ces bactéries (Mannitol-).

Les colonies sont entourées ainsi d'un halo opaque et blanchâtre la présence de cette zone se réfère à l'hydrolyse de la lécithine du jaune d'œuf due à la lécithinase produite par les *Bacillus Cereus*, en choline soluble et diglycérade insoluble qui précipitent dans le milieu en formant un trouble.



Figure 08 : Isolat de *Bacillus cereus* sensu lato sur gélose Mossel à émulsion de Jaune d'œuf.

II.2.2. Prévalence et dénombrement de *B. cereus* sensu lato des épices utilisées

II.2.2.1. Prévalence de *B. cereus* sensu lato dans les échantillons analysés

Le tableau ci-dessous présente les prévalences (%) des spores de *B. cereus* sensu lato dans les différentes épices et herbes utilisées dans la région de Laghouat. Un total de 36 épices provenant de quatre endroits différents, l'un des prélèvements est conditionné, les autres vendus en vrac.

Les résultats ont montré que 72% des condiments analysés ont été contaminés, dont

(8) épices chaudes avaient une contamination totale de 100% par les spores du groupe *B. cereus*.

Les épices douces ont été toutes contaminées avec des prévalences qui varient entre 66

% et 75% tandis que les herbes aromatiques avaient une prévalence de 100 % à l'exception du thym 66 %, la poudre de l'ail et laurier qu'ils étaient négatives.

Les épices aromatiques ont été contaminées avec des résultats différenciés entre 33% et 75%.

Ces résultats indiquent que les épices chaudes sont les plus contaminées malgré que leur nature chimique composée spécifiquement par l'anéthol, l'eugénol et le thymol, présente fortement un caractère antimicrobien qui ne favorise pas une forte contamination, ces prévalences donc sont opposées avec les résultats de **Wolfgang Kneifel et Erika (1993)**.

Le degré de la contamination microbienne des épices est principalement influencé par les conditions d'hygiène et du non-respect des bonnes pratiques.

Tableau 03 : Prévalences (%) de *B. cereus* sensu lato dans les épices utilisées dans

La Wilaya de Laghouat.

| Type d'échantillons | Epices | Nombre d'échantillons | Echantillons positifs | Prévalence (%) |
|---------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| Epices chaudes | Poivre noir | 4 | 4 | 100 |
| | Gingembre | 4 | 4 | 100 |
| Epice douces | Coriandre | 3 | 2 | 66 |
| | Mélange | 4 | 3 | 75 |

| | | | | |
|-----------------------|----------------|---|---|-----|
| Epices Aromatiques | Cumin | 4 | 3 | 75 |
| | Fenu grec | 3 | 1 | 33 |
| | Curcuma | 4 | 3 | 75 |
| | Saffran | 3 | 1 | 33 |
| Herbes aromatique | Thym | 3 | 2 | 66 |
| | P.d'oignon | 1 | 1 | 100 |
| | P.d'ail | 1 | 0 | 0 |
| | Epc. schawerma | 1 | 1 | 100 |
| | Laurier | 1 | 0 | 0 |

II.2.2.2. Dénombrement du groupe *B. cereus* dans les échantillons d'épices analysées

Le dénombrement des spores de *Bacillus cereus* dans les épices vendues dans la ville de Laghouat et obtenues après un traitement thermique à 80 °C pendant 10 min. dont 72% (26/36) des échantillons analysés sont contaminés par le groupe *Bacillus cereus*, le tableau suivant montre les différentes concentrations des échantillons d'épices, avec le nombre de spores qui varie entre 1.07×10^4 et 8.40×10^6 .

Les épices chaudes tel que le poivre noir et le gingembre étaient les plus contaminés ou le nombre de spores est dans un intervalle inacceptable jusqu'à 10^6 , ces résultats sont donc opposés avec celles de (Pafumi, 1975) car ces auteurs ont observé que les niveaux de contamination étaient généralement faibles (10^3 /g) poivre noir.

Les résultats des épices douces et aromatiques ont montré une très forte contamination par rapport à celles de (Pafumi, 1986) ($<10^3$ /g).

Une concentration de 10^6 Ufc /g est responsable de la survenue d'épidémies d'intoxication alimentaire à *B. cereus* qui doit être signalée (InVS, 2010).

Nos données montrent que le niveau de contaminations le plus élevé était des épices conditionnées et les épices de la région de chétit qui font 100% de contamination.

Nos résultats indiquent également un niveau de contamination inacceptable et cela pourrait être attribuable à la méthode de récolte, transport, emballage ... jusqu'à la consommation.

Tableau 04 : Résultats du dénombrement (ufc/g) des spores de *B. cereus* sensu lato dans les épices utilisées dans la Wilaya de Laghouat.

| Types d'épices | Epices | Nombre d'échantillons | Concentration en Ufc/g | |
|----------------|-------------|-----------------------|------------------------|--------------------|
| | | | Min | Max |
| Epices chaudes | Poivre Noir | 4 | 5.60×10^4 | 6.63×10^6 |
| | Gingembre | 4 | 1.07×10^4 | 8.40×10^6 |
| Epices douces | Mélange | 4 | 2.90×10^6 | 2.90×10^6 |
| | Cumin | 4 | 2.90×10^5 | 3.63×10^6 |
| | Fenu grec | 3 | 5.28×10^6 | 5.28×10^6 |
| | Curcuma | 4 | 2.25×10^5 | 4.14×10^6 |
| | Saffran | 3 | 4.36×10^6 | 4.36×10^6 |

II.2.2.3. Prévalences de différents endroits de prélèvements

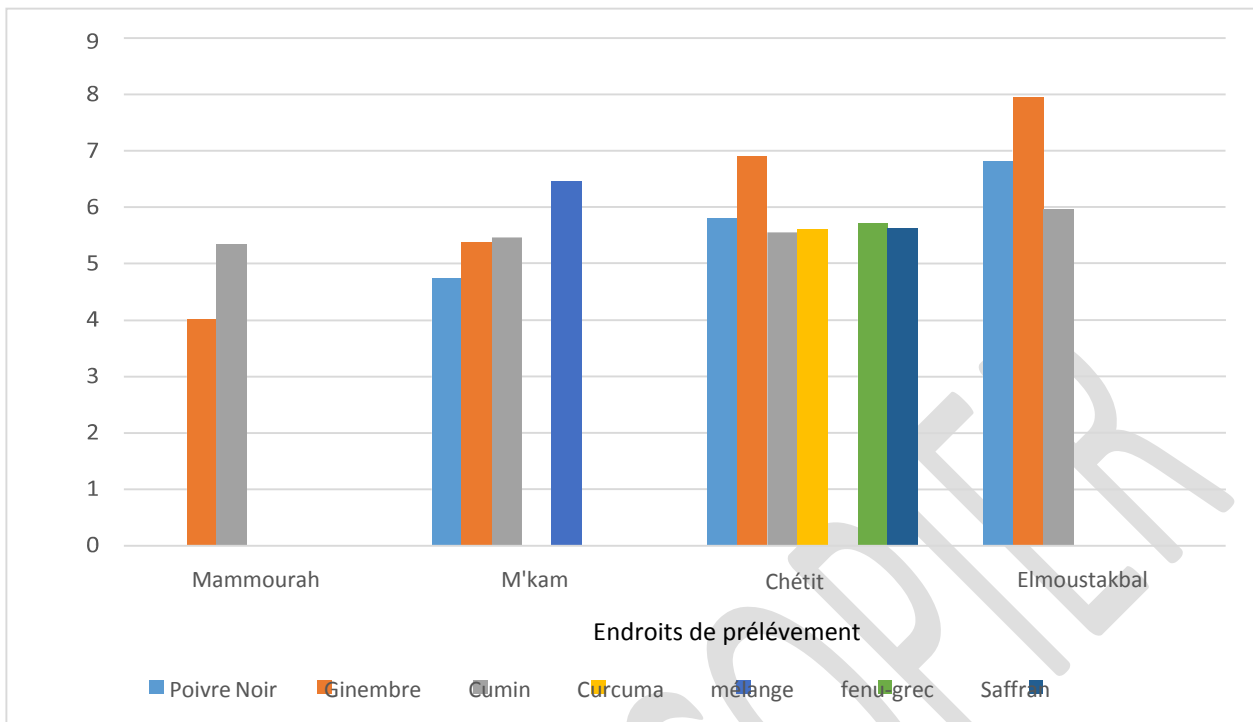


Figure 09 : Concentrations de *Bacillus cereus* sensu lato en (Log Ufc/g).

II.2.3. Production et conservation des spores de *Bacillus cereus* sensu lato

II.2.3.1. Les pré-cultures des *Bacillus cereus*

Après incubation de 24 h à 30°C des tubes BHIB la croissance des colonies se traduit par l'apparition d'un trouble microbien sur le tube.



Figure 10 : Observation macroscopique des pré-cultures de *B. cereus*, tube a) milieu liquide BHIB avant incubation ; b) croissance des *B. cereus* se manifeste par un trouble microbien.

Les colonies sont ensuite ré-purifiées sur la surface d'une gélose nutritive.

II.2.4 Purification des isolats de *B. cereus sensu lato*

Les figures (a) et (b) montrent les cultures pures développées sur un milieu nutritif gélosé se manifeste par la formation d'un tapis de spores sur la surface des boîtes après un temps



nécessaire d'incubation pour la sporulation de la population bactérienne.

Figure 11 : des cultures pures des isolats de *B. cereus*.

II.2.4.1. Récupération des culots de spores

Après opérations de centrifugation suivie d'une série de lavage on obtient un stock de spores qui doit se conserver à 4°C.

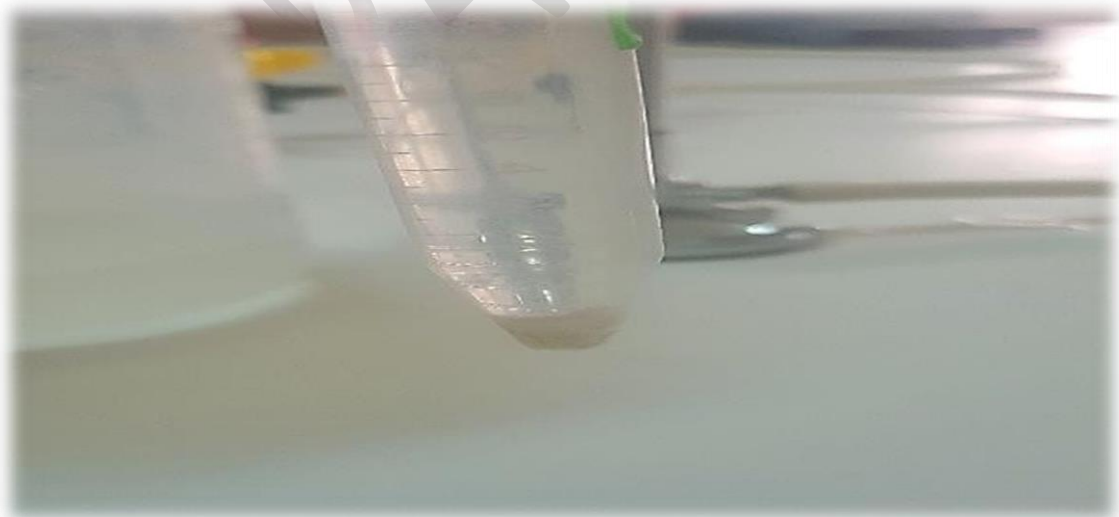


Figure 12 : Obtention de stocks de spores de *Bacillus cereus sensu lato*.

La préparation et la conservation des spores tend à réaliser un stockage à longue durée à fin d'achever d'autres études telles l'étude de la thermorésistance de spores de *Bacillus cereus* sensu lato, l'identification et l'affiliation moléculaire des isolats.

Le caractère de Thermorésistance était déjà prouvé par l'existence des *Bacillus cereus* après traitement thermique de 80°C.

NE PAS COPIER

Conclusion

Les produits appartiennent au groupe des aliments à faible teneur en eau sont très variés tel que les épices et le herbes séchés, avec cela plusieurs épidémies sont associées à la consommation des produits déshydratés était liées à la présence de la principale source pathogène notamment *B. cereus*.

Malgré l'ingestion du microorganisme en faible concentration, peut poser un problème dans un aliment à faible (A_w). En effet ces pathogènes peuvent rester viables à l'état sec pendant longtemps en raison de leurs spores résistantes à des températures de cuisson lors de l'ajout à un aliment.

Cependant les *B. cereus* sont souvent avérés les principales sources responsables d'épidémies d'intoxications alimentaires et cause fréquente de détérioration des aliments.

L'objectif de ce travail était de rechercher, dénombrer les spores du groupe *B. cereus* dans les épices utilisées dans la région.

Les échantillons traités ont enregistré des concentrations élevées varient entre 10^4 et 10^6

(Ufc/g), tandis que les épices chaudes ont marquées une contamination de 100%. Ainsi que les épices douces et aromatiques ont signalé des concentrations différenciées et très élevées. La plus forte contamination été observée aux type d'épices conditionnées de (cité el moustakbal).

On constate que la contamination dépend du type d'épices utilisées et au lieu de prélèvement. L'hygiène du produit et la méthode de préparation peuvent être aussi des facteurs influençant cette contamination.

En effet ce travail présent un intérêt dans l'évaluation du risque lié à la consommation de ces produits et leur qualité microbiologique, pour achever cette tache il est important :

- D'élargir la zone d'étude et la multitude de prélèvements (un prélèvement de 5 endroits au minimum) pour obtenir un échantillon représentatif.
- D'étudier la croissance des isolats et approfondir l'étude de Thermorésistance des spores de *B. cereus*.
- L'identification et l'affiliation moléculaire des isolats.
- Finalement de discuter ces résultats avec des autorités compétentes.

CUQ, J.L (2007) Microbiologie Alimentaire, université des sciences techniques de Montpellier II, septembre 2007.

Herman, L., 2015. Herb & Spice Companion: the Complete Guide to over 100 Herbs & Spices. Wellfleet Press, New York, NY.

Sanaa, M. (2002) Microbiologie prévisionnelle : Principaux modèles de croissance utilisés en appréciation quantitative des risques. *Epidémiol. Et santé anim*, 41, 169-177.eE

Levy, C. (2010) Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires. *Sciences agricoles*. Université d'Avignon, 2010. Français. NNT : 2010AVIG0633ff.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques :

1. **Ainiza, W. M. W., Jinap, S., & Sanny, M. (2015).** Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. *Food Control*, 50, 913e918.
2. **Anonyme (2007).** Fiche produit : Réfrigérateurs, segmentation produits année 2006.
<http://www.gifam.fr>, mise à jour le 18 juillet 2007.
3. **Anses (agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail), 2011.** Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments/Bacillus cereus.
4. **ANTA1, S. P. Study of the Bacillus fora of Nigerian spices. International Journal of Food Microbiology, 6, 259-261 (1988).** Cited in Food Science and Technology Abstracts, 20, 8T44 (1988).
5. **Augustin et Carlier, 2002b ; Augustin, 2003a Augustin, 2003b Augustin et Carlier, 2004).**
6. **Augustin, J.-C., Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L., 2005.** Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1019e1042.
7. **Baiba F., Rita G., Olga V. et Aivas B. 2018.** Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food control.* 83.69-74.
8. **Banerjee et Sarkar, 2004 ; Garcia et al., 2001 ; Witkowska et al., 2011).**
9. **Banerjee, M., Sarkar, P.K., 2004.** Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. *Food Control* 15, 491e496.
10. **Baranyi, J. & Roberts, T. A. (1994).** A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 3–4, 277–294.
11. **Brown, D., Rothery, P., 1993.** Models in Biology: Mathematics, (Eq. (11)) estimated a t value of 32.93 h, while 42D Statistics and Computing. John Wiley and Sons, Chichester.
12. **Buchanan, R. L., Whiting, R. C. & Damert, W. C. (1997).** When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, 14, 313–326.
13. **Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C & Schmitt P (2004)** Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* 97 : 214–219
14. **Codex Alimentaire.2015.** Code d'usages en matière d'hygiène pour les aliments à faible teneur en eau. FAO et OMS. Pp 26.

15. **Cole, M.B., Davies, K.W., Munro, G., Holyoak, C.D., Kilsby, 4. Conclusion D.C., 1993.** A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *J. Ind. Microbiol.* 12, 232– The first order kinetic model, the Buchanan model 239.
16. **Delmas G, Gallay A, Espié E, Haeghebaert S, Pihier N, Weill F-X, et al.** Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bull Epidémiol Hebd.* 2006;(51-52) : 418-22.
17. **Dictionnaire Larousse** (édition 2012).
18. **Dierick et al., 2005 ; Lund et al., 2000 ; Messelhäuser et al., 2014 ; Naranjo et al., 2011 ; Tschiedel et al., 2015)**
19. **Dierick K., Van Coillie E., Swiecicka I., Meyfroidt G., Devlieger H., Meulemans A., et al. (2005).** Épidémie de famille fatale de *Bacillus cereus* -Associated intoxication alimentaire. *J. Clin. Microbiol.* 43 4277–4279. 10.1128 / JCM.43.8.4277-4279.2005
20. **Ehling-Schulz M, Fricker M & Scherer S (2004b)** *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res* 48: 479–487
21. **Farkas J (2000)** Spices and herbs. In: Lund BM, Baird-Parker TC, and Gould GW (eds.) *The Microbiological Safety and Quality of Food*, vol. I, pp. 897–918. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc.
22. **Fedhila, S., Daou, N., Lereclus, D., Nielsen-LeRoux, C., 2006.** Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects: 150 *Bacillus cereus* internalin. *Mol. Microbiol.* 62, 339–355.
23. **Frazier WC, Westhoff DC (1978).** *Food microbiology*. McGraw Hill, New York. 370 p.
24. **Gaillard S., 2003.** Modélisation de la Thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus*, en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale. 142 p.
25. **Gilbert RJ & Kramer JM (1984)** *Bacillus cereus* entérotoxines : present status. *Biochem Soc Trans* 12 : 198–200.
26. **Hertwig, Reineke, Ehlbeck, Knorr et Schluter, 2015; Warda, Tempelaars, Abee et- Groot, 2016).**
27. **InVS (2010).** Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *BEH* no 31-32.

28. **Jessica E., Fatma G. et Anne P., Satinder K. & Khaled B. 2015.** Spice Use in Food: Properties and Benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
29. **Kneifel w. & Berger E. 1993.** Microbiological Criteria of Random Samples of Spices.
30. **Koutsoumanis, K., A. Stamatiou, P. Skandamis, and G.-J. E. Nychas. 2006.** Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 :124–134.
31. **Kramer J.M., Gilbert R.J. (1989).** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Journal of Food borne Bacterial Pathogens* (Doyle MP, ed). 21-70. Marcel Dekker, New York
32. **L'école doctorale GAIA Et de l'unité de recherche Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA – UMR 408)**
33. **McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T. & Ratkowsky, D. A. (1993).** *Predictive Microbiology*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK. **Merzougui S., Lkhider M. and Cohen N. (2013).** *Bacillus cereus*, un réel problème pour l'industrie agroalimentaire ? *Science Lib Editions Mersenne*. 5, 130915
34. **Meyer A., Deiana J. et Bernard A., 2004.** *Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés*. 2ème éd. Hongrie : Ed doin. 430 p.
35. **Microbiologie alimentaire - STIA 2).**
36. **Pafumi, J. (1986)** Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. *Journal of Food Protectio.* 49. pp 958-963.
37. **Peter K. 2001.** in peter introduction: *Handbook of herbs and spices*. Published by Woodhead Publishing Limited. pp332.
38. **Raevuori et Genigeorgis en (1975), Mossel et al. (1967) et Peters et al. (1991).**
39. **Ross, T. & McMeekin, T. A. (2003).** Modeling microbial growth within food safety risk assessments. *Risk Analysis* 23, 179–197.
40. **Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S. & Flandrois, J. P. (1995).** Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 610–616.
41. **Schaarschmidt W, Rana S, Stepan H:** The course of angiogenic factors in early- vs. late-onset preeclampsia and HELLP syndrome. *J Perinat Med* 41 : 511–516, 2013.

42. **Schaarschmidt, S., Spradau, F., Mank, H., Banach, J. L., Fels-Klerx, H. J., Hiller, P., et al. (2016).** Public and private standards for dried culinary herbs and spices e Part II: Production and product standards for ensuring microbiological safety. *Food Control*, 70, 360e370.
43. **Schweiggert U., Mix k., Schieber A.et Carle R.2004.** An innovative process for the production of spices through immediate thermal treatment of the plant material Innovative. *Food Science and Emerging Technologies*.6. pp143– 153.
44. **Stenfors Arnesen LP, O’Sullivan K & Granum PE (2007)** Food poisoning potential of *Bacillus cereus* strains from Norwegian dairies. *Int J Food Microbiol* 116: 292–296.
45. **Sutherland AD & Limond AM (1993)** Influence of pH and sugars on the growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*. *J Dairy Res* 60: 575–580
46. **UNIDO et FAO.2005.** Herbs, spices and essential oils Post-harvest operations in developing countries. pp70.
47. **Unité de recherche : épidémiologie et analyse des risques, Ecole Nationale**
48. **Vétérinaire d’Alfort, 7, avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons Alfort, France).**
49. **Whiting, R.C., Buchanan, R.L., 1992.** Use of predictive microbial nongrowth environments. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 231–243. modeling in a HACCP program. *Proceedings of the Second ASEPT International Conference: Predictive Microbiology and HACCP.* ASEPT, Laval Cedex, France, pp. 125–141.
50. **Witkowska, A. M., Hickey, D. K., Alonso-Gomez, M., & Wilkinson, M. G. (2011).** The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control*, 22, 616e625.
51. **Ziane M., Desriac N., Le Chevalier P., Couvert O Moussa-Boudjemaa B.& Legueri- nel I.2014.** Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic spore-form- ing bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous. *Food control*.45. pp16-21.
52. **Zwietering, M.H., Wijtzes, T., de Wit, J.C., van’t Riet, K., 1992.** A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Food Prot.* 55, 973 – 979.

Annexe

Annexe 01 : les milieux de culture

Milieux MOSSEL :

La gélose approprié pour la *Bacillus cereus* dit sélective c'est le Mossel ce dernier est utilisé pour le dénombrement et la détection *des* spores et formes végétatives de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires. Leur composition c'est :

Mossel complet :

Milieu Mossel de base..... 90ml.

Solution de Poly myxine B 1ml.

Émulsion de jaune d'œuf..... 10ml.



Mossel de base :

ED 900ml.

-Extrait de viande 1 g/l.

-Peptone. 10g/l.

-Sodium chloride 10g/l.

-D-mannitol 10g/l.

-Rouge de phénol.....0.025g.

-Agar-agar 13,5 g/l.



Préparation :

Émulsion de jaune d'œuf :

- Rincer l'œuf à l'alcool, jeter l'excès d'alcool, flamber l'œuf entre deux becs bunsen.
- Récupérer le jaune d'œuf dans un bécher pasteurisé, le diluer avec de l'eau distillée stérile, homogénéiser le tout à l'aide d'un écouvillon afin d'avoir une émulsion.
- Récupérer 10ml d'émulsion et l'ajouter stérilement dans chaque flacon contenant le Milieu Mossel de base stérile.



-Autoclaver les flacons à 121°C pendant 15 minutes.



Ajustement de PH de milieu à 25 °C : $7 ; 2 \pm 0,2$



BHIB: (Brain Heart Infusion Broth):

-ED.....1L.

-Poudre de BHIB.....37g /L.

Préparation :

- Agitation lente jusqu'à la dissolution.

-Répartir en tube a visse de 9 ml.

-Autoclavage à (121°C durant 15 minutes).

- Ajustement de pH de milieu à 25°C (7.4 ± 0.2)

Diluant TSE (Tryptone Sel Eau) :

-ED.....1L.

-Diluant déshydraté.....16,1g /L.

Préparation :

-Mettre la suspension à ébullition sous agitation jusqu'à la dissolution du composant.

-Remplir la solution dans des flacons (90ml) et des tubes (9ml).

-Ajuster le pH à 7.2

Gélose nutritive :

-MnSo₄.....40mg/l.

-Calcium chloride de di hydrate.....100mg/l.

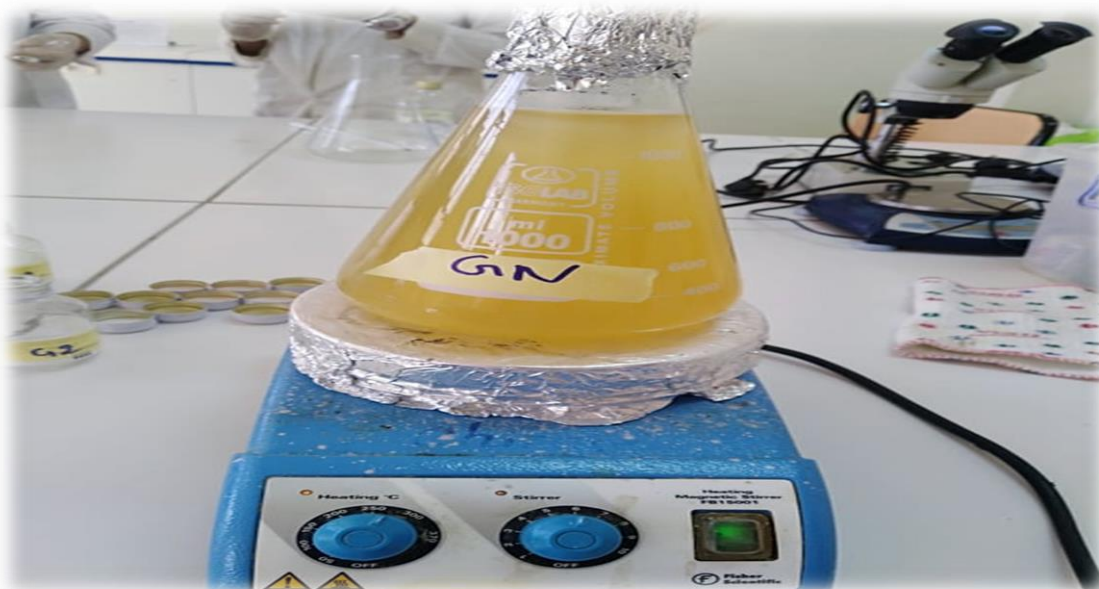
-Gélose nutritive.....23g/l.

Préparation :

-Faire dissoudre ces composants dans un litre d'eau déminéralisée.

-Porter le tout sur une plaque chauffante sous agitation.

-Répartir le milieu préparé en flacons 90mL.



-Enfin autoclaver les flacons pendant 15 minutes à 121°C.

Annexe 02 : Les différents tests effectués

1. Coloration de Gram

Principe :

La morphologie, l'arrangement et la forme des cellules des isolats sont déterminées par la coloration de Gram

Cette complexe coloration permet de distinguer les bactéries GRAM + des GRAM – grâce à la de nature de leurs parois.

Préparation du frotti :

Après une stérilisation d'une lame de microscope on étale une couche mince des colonies, puis passant la lame rapidement dans la flamme de bec bunsen a deux ou trois prise pour la fixation par chaleur (la fixation a pour but de tuer les cellules bactériennes).

La coloration :

1: Versement de quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis et attendre pendant 1 minute
Elimination de l'excès de violet de gentiane avec un peu de l'eau sans insister.

2: Plonger la lame une minute dans lugol puis on rince abondamment avec de l'eau de robinet.

3: Décolorer le violet avec de l'éthanol /acétone des 2 côtés de la lame puis on rince toujours l'eau.

4: plonger la lame 1 minute dans la fushine et laisser agir pendant 10min puis on rince à l'eau.

5: Enfin sécher la lame.

Mise au point :

-Commençons d'abord par l'objectif ×40.

-Ensuite l'observation microscopique *B. cereus* par (microscope optique G×100 à immersion).

Résultats :

La coloration montre des bacilles de couleur violette sont fortement dites Gram positive, et cela veut dire qu'elles ont une paroi épaisse qui ne se décolore pas lors de l'ajout de L'alcool.

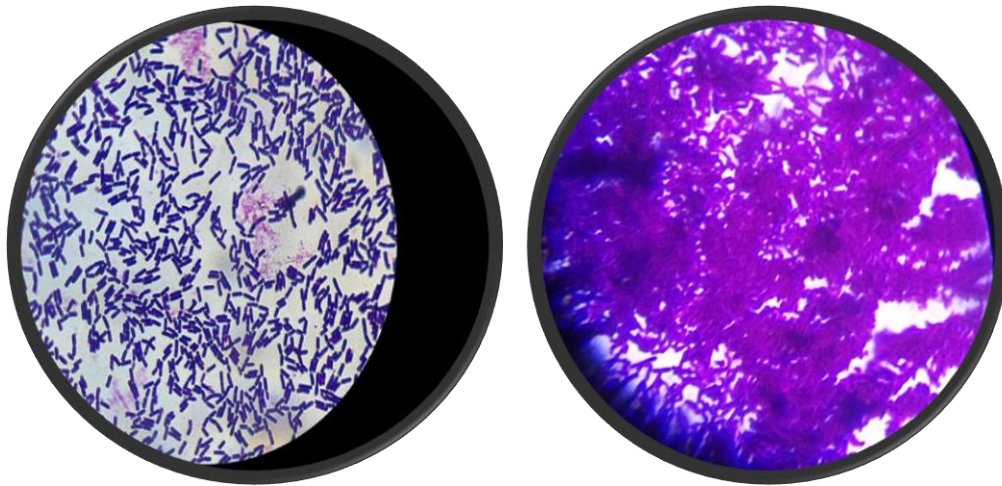


Figure 1: Résultat d'observation microscopique des *B.cereus* par (microscope optique G×100 à immersion) après une coloration de GRAM.

2. Examen à l'état frais

Principe :

La mise en évidence de la forme des colonies bactériennes.

Préparation :

-A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile une petite quantité de suspension a été prélevée et mis entre lame et lamelle plus l'ajout d'une goutte du Bleu de méthylène.

Mise au point :

- L'observation était effectuée par l'objectif $\times 100$ plus huile à immersion.

Résultats :

-Les cellules apparaissent en bâtonnets.

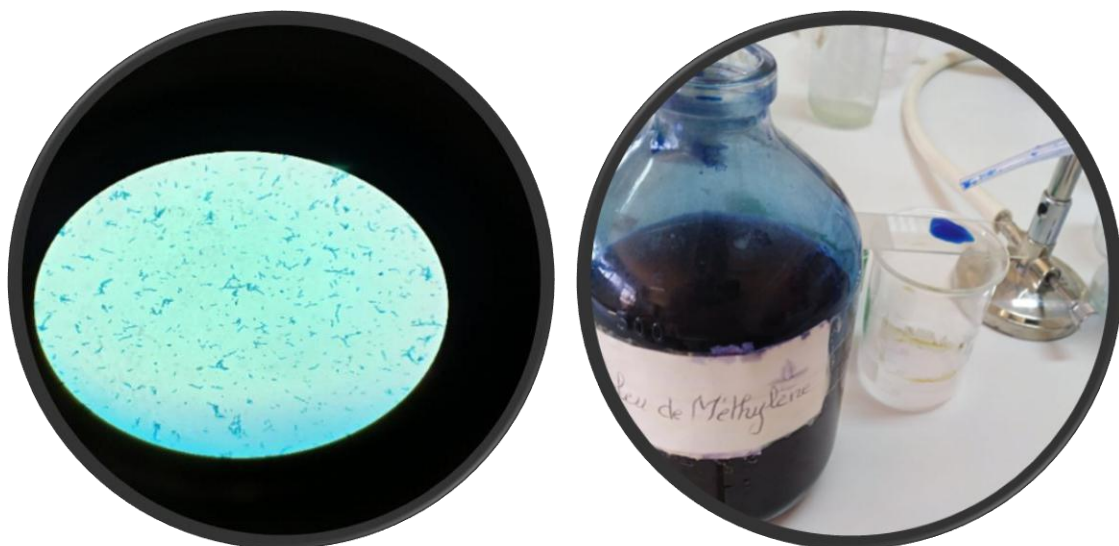


Figure 2 : Observation microscopique des cellules de *B. cereus* à l'état frais avec le bleu de méthylène à l'objectif ($G \times 100$ à immersion).

3. Coloration au vert de malachite

Principe :

Cette technique permet de mettre en évidence la présence de spores au sein d'une cellule bactérienne.

Préparation :

- Après la réalisation d'un frottis fixé est recouvert de vert de malachite, puis le chauffer jusqu'à émission de vapeur (pendant 10 minutes).

-Refroidissement et lavage.

-Puis l'ajout de la contre coloration sur la lame qui est safranine (pendant 2 minutes).

-Refroidissement et lavage à nouveau.

Mise au point :

Observation à l'objectif 100 à immersion.

Résultats :

Les spores apparaissent vertes dans les corps bactériens roses.

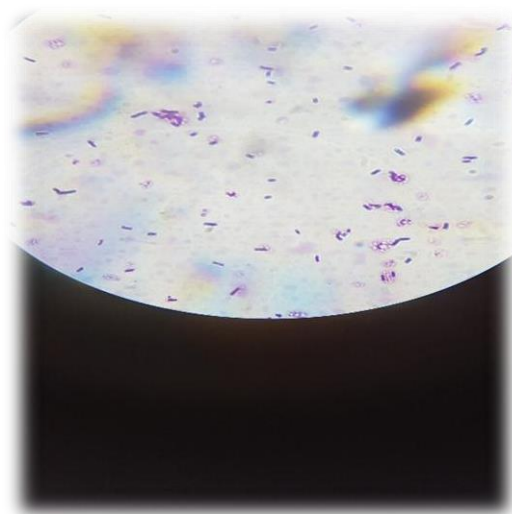
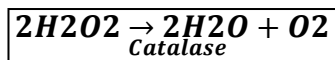


Figure 3 : Observation microscopique des endospores de *B. cereus* par l'objectif (G 100 à immersion).

4. La recherche de la catalase

Principe :

La détermination de la capacité de la Bactérie à synthétiser l'enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène(H₂O₂) toxique avec un dégagement d'O₂ selon la réaction suivante :



Préparation :

-On dépose une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile.

-à l'aide d'une anse stérile prélever une colonie de B. cereus.

-mélanger la colonie avec la goutte.

Résultats :

La formation des bulles d'oxygène avec un dégagement de gaze indique que la bactérie possède la catalase, donc dite **Catalase +**.



Figure 2: Résultat du test catalase.

5. Test mannitol-mobilité

Principe :

C'est un test permettant de déterminer si la bactérie est **mobile ou non** ainsi que sa capacité à fermenter le mannitol.

Préparation :

-Milieu utilisé est de mannitol mobilité en tubes à essai.

-L'ensemencement des milieux se réalisait par piqure centrale.

-Incubation à 30°C pendant 48h.

Résultats :

Les colonies diffusent à partir de ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu, donc la bactérie dites : **Mobiles**.



Figure 3: formation des colonies de *B.cereus* dans le centre du tube.

6. Etude du type respiratoire

Gélose VF (viande –foie)

Principe :

Pour connaître le type respiratoire de la *Bacillus cereus* c'est-à-dire son comportement vis-à-vis la présence du dioxygène.

Certaines bactéries ne peuvent vivre qu'en son absence, d'autres qu'en sa présence.

Préparation :

Commençant par le prélèvement d'une colonie pure et la mettre dans un tube contient de la viande foie (VF) par technique de touche centrale, puis incubation à 37°C pendant 24h à 48 h.

Résultats :

L'apparition des colonies au niveau de tout le tube, la bactérie dite : Aero-anaerobie facultatif.



Figure 4:Apparition des colonies de *B.cereus* sensu lato au niveau du tube Viande-Foie.

7. Test d'hémolyse

Principe :

Est un milieu enrichi de sang (5% de sang de cheval) additionné à la base, permettant l'isolement des bactéries exigeantes présentant une large réaction hémolytique

-Si la digestion est totale, la couleur rouge disparaît avec une zone éclaircie (hémolyse partielle), si voir incolore (hémolyse complète). On parle alors **d'hémolyse β** .

-Si digestion incomplète il se forme des produits verdâtres ou marrons on parle **d'hémolyse α** .

Préparation :

L'ensemencement de colonies de la *Bacillus cereus* dans des boîtes coulées précédemment s'effectue en stries.

Incubation 30°C pendant 48h.

Résultats :

Présente hémolyse positive dont le type est variable selon la souche

- β hémolytique complète et α hémolytique.

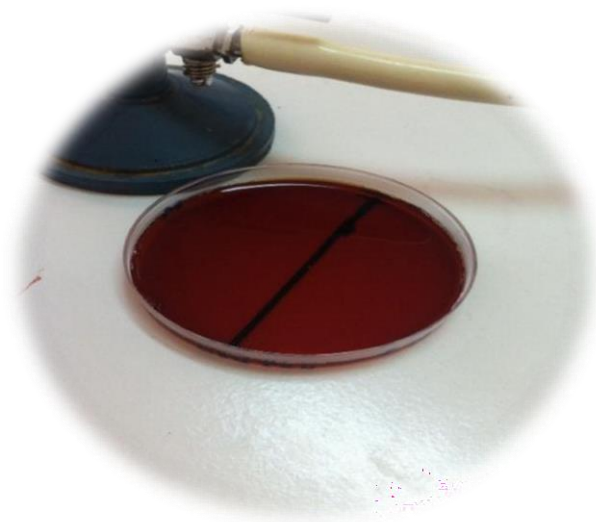


Figure7 : Milieu gélose au sang

Annexe 03 : Statistiques épidémiologiques des (TIAC) dans la région de Laghouat**De 2015 :**

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
 MINISTRE DE LA SANTE, DE LA POPULATION ET DE LA REFORME HOSPITALIERE

Direction de la Santé et de la Population de Laghouat
 Service de la prévention et de la Population

SITUATION EPIDEMIOLOGIQUE DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRE COLLECTIVES ANNEE 2015

| COMMUNME | Mois et date | Nombre de cas | Nombre de foyers | Nombre de mis en observations | Nombre de décès | Circonstance d'apparition | Aliments incriminé |
|-------------|--------------|---------------|------------------|-------------------------------|-----------------|--|--|
| Laghouat | 05/07/2015 | 07 | 01 | 07 | 00 | Suspicion d'aliments saupoudrés par les eaux usés | Pastèque |
| | 25/08/2015 | 11 | 01 | 11 | 00 | Manque d'hygiène | Cépage |
| K-E-Hirane | 01/02/2015 | 03 | 01 | 03 | 00 | Conservation de la crème pâtissière plus de 48 heures | pâtisserie |
| | 04/02/2015 | 08 | 01 | 08 | 00 | Manque d'hygiène | ! |
| | 22/06/2015 | 04 | 01 | 04 | 00 | Manque d'hygiène | ! |
| | 18/07/2015 | 02 | 01 | 02 | 00 | Manque d'hygiène | ! |
| | 02/08/2015 | 04 | 01 | 04 | 00 | Manque d'hygiène | Viande d'hachée |
| | 12/09/2015 | 05 | 01 | 05 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite | Olve |
| Hassi Delaa | 07/07/2015 | 11 | 01 | 11 | 00 | Suspicion d'aliments saupoudrés par les eaux usés | Pastèque |
| Aflou | 04/06/2015 | 03 | 01 | 03 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite | Repas traditionnel (Kouskous préparé au niveau de la maison) |
| | 13/07/2015 | 09 | 01 | 09 | 00 | Suspicion d'aliments saupoudrés par les eaux usés | Pastèque |
| | 20/07/2015 | 04 | 01 | 04 | 00 | Suspicion d'aliments saupoudrés par les eaux usés | Pastèque |
| | 27/07/2015 | 04 | 01 | 04 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite | Repas traditionnel (Kouskous préparé au niveau de la maison) |
| Sidi Bouzid | 06/08/2015 | 08 | 01 | 08 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite | Lait |

De 2016 :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
 MINISTERE DE LA SANTE, DE LA POPULATION ET DE LA REFORME HOSPITALIERE

Direction de la Santé et de la Population de Laghouat
 Service de la prévention et de la Population

SITUATION EPIDEMIOLOGIQUE DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRE COLLECTIVES ANNEE 2016

| COMMUNE | Mois et date | Nombre de cas | Nombre de foyers | Nombre de mis en observations | Nombre de décès | Circonstance d'apparition | Aliments incriminé |
|-----------|--------------|---------------|------------------|-------------------------------|-----------------|---|--|
| Laghouat | 27/01/2016 | 13 | 01 | 13 | 00 | des cas déclarés d'après les symptômes cliniques (Il ya pas le plat témoin) | / |
| | 02/02/2016 | 03 | 01 | 03 | 00 | des cas déclarés d'après les symptômes cliniques (Il ya pas le plat témoin) | / |
| | 27/04/2016 | 06 | 01 | 06 | 00 | des cas déclarés d'après les symptômes cliniques (Il ya pas le plat témoin) | / |
| | 14/05/2016 | 42 | 01 | 42 | 00 | Conservation de la mayonnaise plus de 48 heures | aliments divers |
| Afrou | 19/07/2016 | 22 | 01 | 22 | 00 | Conservation de la crème pâtissière plus de 48 heure | pâtisserie |
| El Beidha | 17/03/2016 | 11 | 01 | 11 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite | Repas traditionnel (Kouskous préparé au niveau de la maison) |

De 2017 :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
 MINISTRE DE LA SANTE, DE LA POPULATION ET DE LA REFORME HOSPITALIERE

Direction de la Santé et de la Population de Laghouat
 Service de la prévention et de la Population

SITUATION EPIDEMIOLOGIQUE DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRE COLLECTIVES ANNEE 2017

| COMMUNE | Mois et date | Nombre de cas | Nombre de foyers | Nombre de mis en observations ¹ | Nombre de décès | Circonstance d'apparition | Aliments incriminé |
|-----------------|--------------|---------------|------------------|--|-----------------|--|--|
| Laghouat | 16/02/2017 | 04 | 01 | 04 | 00 | Manque d'hygiène | Vande d'hachée |
| | 25/05/2017 | 03 | 01 | 03 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite chez un petit magasin | Gâteau traditionnel (mechacoucha) |
| | 27/03/2017 | 06 | 01 | 06 | 00 | Manque d'hygiène | Vande d'hachée |
| Kaser El Hirane | 06/02/2017 | 04 | 01 | 04 | 00 | Conservation de la crème pâtissière plus de 48 heure | pâtisserie |
| | 18/07/2017 | 06 | 01 | 06 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite | Repas traditionnel (Kouskous préparé au niveau de la maison) |
| | 02/03/2017 | 03 | 01 | 03 | 00 | Manque d'hygiène | Leben traditionnel |
| Aflec | 18/03/2017 | 08 | 01 | 08 | 00 | Conservation de la mayonnaise pâtissière plus de 48 heures | pizza |
| Brida | 24/08/2017 | 08 | 01 | 08 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite | Repas traditionnel (Kouskous préparé au niveau de la maison) |
| Hadj Mechri | 07/08/2017 | 63 | 01 | 63 | 00 | Haricots verts saupoudrés par les eaux usés | Haricots Verts Cru |

De 2018 :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE LA SANTE, DE LA POPULATION ET DE LA REFORME HOSPITALIERE

Vilaya de Laghouat
 Direction de la Santé et de la Population
 Service de la prévention et de la Population

**SITUATION EPIDEMIOLOGIQUE DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRE COLLECTIVES
 ANNEE 2018**

| COMMUNE | Mois et date | Nombre de cas | Nombre de foyers | Nombre de mis en observations | Nombre de décès | Circonstance d'apparition | Aliments incriminé | Observation/ Germe retrouvé |
|-------------|--------------|---------------|------------------|-------------------------------|-----------------|--|--|--|
| Kheneq | 18/04/2018 | 15 | 01 | 15 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite chez un petit magasin | Gâteau (marque BRINO) | Il n'y a pas de reste d'aliment incriminé |
| Hassi R'mel | 18/02/2018 | 03 | 01 | 03 | 00 | Marque d'hygiène | aliments divers (sandwich) | Coliformes fécaux Staphylocoques aureus |
| | 02/06/2018 | 77 | 01 | 77 | 00 | Marque d'hygiène | Viande d'hachée | Coliformes fécaux Staphylocoques aureus |
| Sidi Bouzid | 06/07/2018 | 11 | 01 | 11 | 00 | La conservation d'aliment incriminé n'a pas été bien faite en plein de chaleur | Repas traditionnel (Kouskous préparé au niveau de la maison) | Il n'y a pas de reste d'aliment incriminé |

Enquête descriptive sur l'utilisation des épices dans la région de Laghouat

| Questions | Réponses proposées | | Réponses choisis | |
|--|--------------------------------|----|------------------|-----|
| 1-Identification de l'opérateur | Préparation ménagère | | | |
| | Restaurant | | | |
| | cité universitaire | | | |
| | salle des fêtes | | | |
| | autres | | | |
| 2-Nombre de consommateurs | Par famille /par établissement | | | |
| 3 Nombre de préparation par mois | Soupe | | | |
| | Sauces | | | |
| 4- Les épices et les herbes séchés les plus utilisés | 1- | 4- | 7- | 10- |
| | 2- | 5- | 8- | 11- |
| | 3- | 6- | 9- | 12- |
| 5-Originé et structure des épices | Endroit | | | |
| | Structure | | broyés | |
| | | | Non broyés | |
| 6-Durée de stockage chez le consommateur avant utilisation | Cuisine | | 1 mois | |
| | | | 2 mois | |
| | | | 3 mois ou plus | |
| 7- Le conditionnement : | Sous emballage | | Type emballage | |
| | | | Poids | |
| | En vrac | | | |
| 8--Concentration de l'épice | quantité de l'épice | | | |
| | type de récipient | | Cocotte | |

| | | Marmite | |
|---|------------------------|---------|--|
| | volume de récipient | | |
| 9- La fréquence d'utilisation | Tous les jours | | |
| | 2/3 fois par semaine | | |
| | Chaque semaine | | |
| 10- Le mode d'utilisation : | Avant cuisson | | |
| | Durant cuisson | | |
| | Après cuisson | | |
| 11- La durée de cuisson après l'ajout de l'épice | 05 min | | |
| | 10 min | | |
| | 15 min | | |
| | 30 min ou plus | | |
| 12-Température de cuisson | 70°C/80°C/95°C/120°C | | |
| 13-Durée de Stockage de l'aliment après cuisson | Après cuisson | | |
| | après 1ere prise | | |
| | Après 2eme prise | | |
| 14-Condition de stockage de l'aliment après 1ere prise. | Réfrigérateur | | |
| | Congélateur | | |
| | Température ambiante | | |
| 15- Les cas d'intoxications | Oui/non /nombre de cas | | |